

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



**EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA MAYOR
DE LA CÁPSIDA (L1) DEL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO TIPO 18: PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
RECOMBINANTES Y PARTÍCULAS SIMILARES AL
VIRUS (VLPS)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Mónica Martínez Martínez

Bajo la dirección de las doctoras
Laura Benítez Rico y Marta Ortiz Rivera

Madrid, 2009

• **ISBN: 978-84-692-1021-5**

©Mónica Martínez Martínez, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



**EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA MAYOR
DE LA CÁPSIDA (L1) DEL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO TIPO 18. PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
RECOMBINANTES Y PARTÍCULAS SIMILARES AL
VIRUS (VLPS).**

**TESIS DOCTORAL
POR
MÓNICA MARTÍNEZ MARTÍNEZ**

DIRECTORAS:

Dra. LAURA BENÍTEZ RICO

Dra. MARTA ORTIZ RIVERA

MADRID, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III

**EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA MAYOR
DE LA CÁPSIDA (L1) DEL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO TIPO 18. PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
RECOMBINANTES Y PARTÍCULAS SIMILARES AL
VIRUS (VLPS).**

Tesis doctoral presentada por
Mónica Martínez Martínez
para optar al grado de Doctora en Biología por la
Universidad Complutense de Madrid

Directoras:
Dra. Laura Benítez Rico

Dra. Marta Ortiz Rivera

MADRID, 2008

La ciencia es como la Tierra, sólo se puede poseer un poco de ella.
La ignorancia niega o afirma rotundamente, la ciencia duda.
(François Marie Arouet, Voltaire)

La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso.
(Louis Pasteur)

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directoras de tesis por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo junto a ellas. Gracias por confiar en mí, por la paciencia y por todo lo que me han enseñado. Por ser un ejemplo a seguir, en cuanto a profesionalidad, tenacidad y superación. Gracias también por su trato humano, comprensión y apoyo no sólo en lo profesional, sino también en lo personal.

A los que han sido directores del departamento de Microbiología III durante mi experiencia en él, el Dr. José Martínez Peinado y la Dra. Covadonga Vázquez Estévez, por permitirme realizar mis estudios de doctorado junto a ellos y por el interés mostrado por mi trabajo y la evolución del mismo, así como por estar siempre dispuestos a echar una mano. Gracias a todas las personas del departamento, profesores, becarios, técnicos y secretario, por hacer de estos años algo que no olvidaré.

A la Dra. Elizabeth Unger, y a todos los miembros del laboratorio de Papilomavirus humano (CDC), por acogerme y enseñarme tanto durante mis tres meses de experiencia americana. Al profesor Manuel J.T. Carrondo y la Dra. Paula Marques Alves, del laboratorio de Tecnología de células Animales (IBET) por toda la ayuda prestada para la realización de parte de esta tesis doctoral. Gracias también al Dr. Antonio Cunha y a los miembros de su equipo de la Unidad Piloto (IBET-ITQB) por prestarme sus conocimientos y su fermentador. Muchas gracias a todos los miembros del Servicio de Diagnóstico y Referencia de Retrovirus y Papilomavirus (CNM, ISCII) por acogerme en sus laboratorios, por sus conocimientos y su tiempo, en especial a Montse, Angelines y Esther. Gracias también a otros servicios del centro: Parasitología, especialmente a Luismi que siempre estuvo ahí para resolver mis dudas y contestar mis preguntas, al servicio de secuenciación y a Lucinio del animalario.

Muchas gracias a mi familia. Esta tesis no está dedicada a mis padres, porque no es mía, sino suya. Sin ellos que siempre han dado todo por mí, sin su apoyo, comprensión, ayuda, paciencia infinita, cariño, cuidados, y un largo etcétera, no hubiese sido posible. Muchas gracias papá y mamá. A mi hermana Cristina, por confiar siempre en mí y en mis posibilidades, por su ayuda y su apoyo moral, por ocuparse de aquello de lo que yo, por falta de tiempo, no podía. Gracias de corazón. A mis hermanos Luis Miguel y Marisol, por sus consejos, y su apoyo desde la lejanía. A mis sobrinos David, Jorge y Paula y Helena por su alegría, por hacerme reír cuando otras cosas me hacían estar triste, por los tita Moni, por enseñarme el mundo de los pokémon, de los pressing catch, de las barbies princesas... ¡Gracias mis pequeños!

A mis compañeros de laboratorio. A Laura y Begoña. Un enorme gracias de mamá pata a los 2 patitos: (1) Ale, muchas gracias por tu cariño, tu apoyo, tu compañía, tu cultura (que dio para muchas charlas interesantes y no sólo de ciencia), por tus aviones, canastas, por tus "chachos", por tu hombro... Gracias por todo, aquí o allá, tienes una amiga goda. (2) Eva, por tu apoyo y tu cariño continuo, por las cervecitas sin alcohol de las 21:00 un día de esos interminables... Corto pero intenso. A la Dra. Trinidad Soto a nivel profesional, por su ayuda, sus consejos, y por confiar siempre en mí, y a Triny por tu apoyo moral, por tus reparaciones de ordenadores variados, por la chispa de gracia, ironía y por la vida aportada al labo7-6. A Miguel, por los buenos ratos que pasamos contigo.

A mis vecinos y amigos del labo 8-7. A los que estuvieron (Elena, Manolo, Miguel, Mili, Miriam), y a los que siguen, por todos los momentos inolvidables del día a día, los viernes, las tapitas. Gracias a la Dra. Belén Patiño por su ayuda profesional y sus consejos, por su paciencia, por responder siempre a todas mis preguntas, por sus matraces, sus gramitos de esto y lo otro. A la Pati por su amistad, y por ser la maravillosa persona que es.

A Petra, por preocuparse siempre por mí, por su apoyo y cariño, por ser como eres, muchas gracias. A Jessi y María, por su buen carácter, por llevar siempre una sonrisa... Muchas gracias a Amaia, por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, porque siempre me haces reír, por tu inestimable apoyo personal, por ser tan buena amiga (aunque un poco descastadilla) y por aguantarme algunas veces, que ya tiene mérito. ¡Gracias vecinillos!

A los compis y amigos del labo 11-12, a la pelirroja, a Chuky, a Paquete, a Mapi, a la Plana... Por escucharme, por las risas, por los piropos, por los hombros prestados, por aguantarme, por todo. Muchas gracias, ha sido un placer.

A mis Anas, la psicóloga por todo su apoyo, ayuda, ánimos, oídos para mis problemas. A Anita que compartió pupitre y labo conmigo y sigue compartiendo amistad, porque siempre está pendiente de que esté bien y de que me cuide. Gracias guapas. A los amigos hechos durante estos años a Ursu y Asier (mis fuentes de papers), Ana, Carmen, Sonia, Gaizka, Alicia. Gracias chicos por los buenos momentos a vuestro lado. A Ali pony chiquitín..., gracias por todo, por ser tan buena amiga, por el sushi en L.A., por esos sábados particulares... Espero que esté yendo todo como tú te mereces. Gracias mi niña.

A Álex, por todo lo vivido, por los sueños, por tu apoyo incondicional, por tu amistad, y tu comprensión... Tengo mucho que agradecerte, y sabes que lo hago. Espero que todo te vaya genial, y que al final encuentres tu lugar y te sientas pleno a todos los niveles. Yo estaré siempre aquí.

Gracias a mis niñas, Elena, Esther, Inés, Bei y a mi niño David, porque aunque nos vemos poco y hablamos poco, estáis ahí y lo sé. Yo también estoy. A mi Saharaui preferido, porque sé que se preocupa por mí a su manera especial, y más ahora que ya es maduro y responsable jaja. Gracias a "my special english teacher", y mi locuelo amigo Fran. A mi gentecilla del gym, en especial a Carlos y a Juanjo, por los momentos de desconexión..., ¡a la fuerza!

Thanks to my Villa International family (Camille, Márgara, Hans, Tom, Magdy, Cristoph, Sophio, Rossa, Linda, Lucca, Jeanine, Noorine, Amanie, the kids...). You make much easier my American experience. Special thanks to my sister Caro, and my brother Renato, to my kids Javi and Daniel, to my favourite venezuelan guy Javier, to my dear Kiti, to Carma & Christian...

Muito obrigada a todos os meus colegas do TCA. Obrigada pela sua ajuda no laboratorio, porque vocês sempre tinham tempo pra mim e minhas dúvidas. Muito obrigada pelas cervejas no Hunter beer depois do trabalho, pelo espanhuel (jiji), por convidarme as suas festas, pelos cartões de parabéns de vocês agora que estou longe... Muito obrigada a André, pela sua amabilidade, companhia, por ser mais que um colega de apartamento. Muchas gracias especiales a Vicente y Elisa, porque hicieron mi vida lisboeta mucho más fácil, y mucho más bonita. Y porque aún se siguen preocupando por mí. ¡Gracias guapos!

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la obtención de una beca para la formación de personal investigador, y un contrato de personal investigador en formación en prácticas, concedidos por la Universidad Complutense de Madrid.

Las estancias en centros internacionales han sido posibles gracias a la obtención de dos becas para la realización de estancias breves en España y en el extranjero, concedidas por la Universidad Complutense de Madrid.

La realización del trabajo de laboratorio ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos MPY1117/03 concedido por el Instituto de Salud Carlos III, PR1/06-14477-B concedido por la Universidad Complutense de Madrid, y al proyecto "*Producción de partículas virus-like (VLPs) de papilomavirus humanos de alto riesgo (VPH16/18) con utilidad en la evaluación de respuestas inmune humoral en población infectada y/o vacunada*" concedido por la Fundación Mutua Madrileña.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El virus del papiloma humano (VPH).....	1
1.1.1 Historia	1
1.1.2 Clasificación taxonómica	2
1.1.3 Clasificación epidemiológica	3
1.1.4 Estructura del virus	4
1.1.5 Organización genómica.	5
1.1.6 Ciclo viral	6
1.1.7 Transcripción y expresión de proteínas virales	8
1.1.8 Patogenia	17
1.1.9 Inmunidad	18
1.2 Infección clínica causada por VPH mucosotrópicos.....	20
1.2.1 Infecciones del tracto genital	20
1.2.1.1 Lesiones escamosas intraepiteliales y cáncer de cérvix	20
1.2.1.2 Verrugas anogenitales (condilomas)	23
1.2.1.3 Otras infecciones del tracto genital	23
1.2.2 Otras infecciones	24
1.3 Epidemiología.....	24
1.4 Diagnóstico de la infección por VPH.....	27
1.4.1 Diagnóstico molecular	27
1.4.1.1 Sistemas de amplificación de señal	28
1.4.1.2 Sistemas de amplificación de secuencias diana	28
1.4.2 Examen citológico e histopatológico	29
1.4.2.1 Test de Papanicolau	29
1.4.2.2 Colposcopia	30
1.4.2.3 Biopsia	30
1.4.3 Utilidad clínica del diagnóstico de la infección por VPH	30
1.5 Producción de antígenos de VPH.....	31
1.5.1 Expresión de la proteína L1	31
1.5.2 Expresión de otras proteínas de VPH	34
1.6 Serología de la infección por VPH.....	35
1.7 Desarrollo de vacunas profilácticas.....	36
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Materiales.....	41
3.1.1 Cepas bacterianas	41
3.1.2 Cepas de levaduras	41

3.1.3 Líneas celulares	42
3.1.4 Vectores	42
3.1.5 Muestras clínicas	44
3.1.6 Sueros animales	45
3.1.7 Anticuerpos primarios	45
3.1.8 Anticuerpos conjugados	46
3.1.9 Proteínas comerciales	46
3.1.10 Medios de cultivo	46
3.2 Métodos.....	48
3.2.1 Crecimiento y mantenimiento de cultivos	48
3.2.1.1 Crecimiento y mantenimiento de cultivos bacterianos	48
3.2.1.2 Crecimiento y mantenimiento de cepas de levaduras	48
3.2.1.3 Crecimiento y mantenimiento de células de insecto	48
3.2.2 Extracciones de ácidos nucleicos	49
3.2.2.1 Extracción de ADN plasmídico de bacterias	49
3.2.2.2 Extracción de ADN total de levaduras	49
3.2.2.3 Extracción de ADN total de células de insecto	49
3.2.2.4 Extracción de ARN total de levaduras	50
3.2.2.5 Purificación de ADN mediante fenolización y precipitación con Etanol/Acetato sódico o amónico	50
3.2.3 Amplificaciones de ácidos nucleicos mediante PCR	51
3.2.3.1 Amplificación de la región L1 de VPH18 para expresión en sistemas heterólogos	51
3.2.3.2 Purificación de productos de PCR	53
3.2.4 Secuenciación	53
3.2.5 Retrotranscripción	55
3.2.6 Digestiones enzimáticas de ácidos nucleicos	55
3.2.7 Análisis electroforético de ácidos nucleicos	55
3.2.7.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	55
3.2.7.2 Electroforesis de ARN en geles de agarosa	56
3.2.7.3 Extracción de ADN de geles de agarosa	57
3.2.8 Medida de la concentración y pureza de ácidos nucleicos	57
3.2.9 Reacciones de ligación en vectores de clonación	58
3.2.10 Obtención de células competentes	58
3.2.11 Transformación de células procariotas y eucariotas	59
3.2.11.1 Transformación de <i>E.coli</i> mediante choque térmico	59
3.2.11.2 Transformación de cepas de <i>P. pastoris</i> mediante electroporación	59

3.2.12 Generación de baculovirus recombinantes en células de insecto	60
3.2.13 Obtención de sueros hiperinmunes de ratón	63
3.2.13.1 Obtención de sueros mediante inmunización con la proteína GST-18L1Ct	63
3.2.13.2 Obtención de sueros hiperinmunes mediante inmunización con ADN	64
3.2.14 Ensayos de expresión y purificación de proteínas recombinantes	65
3.2.14.1 Ensayos de expresión de proteínas de fusión en <i>E.coli</i>	65
3.2.14.2 Ensayos de expresión en <i>P.pastoris</i>	71
3.2.14.3 Ensayos de expresión en células de insecto	75
3.2.15 Análisis y caracterización de proteínas	78
3.2.15.1 Diálisis de muestras de proteínas	78
3.2.15.2 Concentración de proteínas	78
3.2.15.3 Determinación de las concentraciones de proteína	79
3.2.15.4 Electroforesis desnaturizante de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE	80
3.2.15.5 Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	81
3.2.15.6 <i>Western Blot</i> : Inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa	82
3.2.15.7 Eliminación de anticuerpos unidos a membranas	84
3.2.15.8 ELISA	84
3.2.15.9 Microscopía electrónica de transmisión	85
3.2.15.10 Análisis por Dispersión Dinámica de Luz	85
4. RESULTADOS	87
4.1 Expresión de proteínas recombinantes de L1 de VPH18 en <i>E.coli</i>.....	88
4.1.1. Amplificación de la región L1 de VPH18	90
4.1.2 Clonación en vectores pGEX	93
4.1.3 Comprobación de la integridad de las construcciones	94
4.1.4 Optimización de la producción de proteínas de fusión recombinantes	94
4.1.4.1 Optimización de la expresión	94
4.1.4.2 Procesamiento de los cultivos inducidos	97
4.1.4.3 Purificación de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad	98
4.1.4.4 Purificación de eluciones obtenidas por cromatografía de afinidad	104
4.1.4.5 Purificación directa de proteínas recombinantes mediante electroelución en PBS o elución en PBS con urea	105
4.1.5 Caracterización inmunológica de las proteínas recombinantes con sueros comerciales y sueros animales	106
4.1.6 Caracterización inmunológica de las proteínas recombinantes con sueros humanos mediante ensayos inmunoenzimáticos	109

4.2 Expresión de proteínas recombinantes de L1 de VPH18 en <i>P.pastoris</i>.....	118
4.2.1 Amplificación de la región L1 de VPH18	120
4.2.2 Clonación en vectores pPICZ y pPICZ α	122
4.2.3 Comprobación de la identidad de las secuencias	123
4.2.4 Obtención de clones recombinantes en <i>P.pastoris</i>	124
4.2.5 Ensayos de expresión de la proteína como proteína de secreción (construcción 18L1Z α)	127
4.2.6 Ensayos de expresión de proteínas en forma nativa para purificación de VLPs	129
4.2.7 Análisis de transcripción de los clones recombinantes	132
4.3 Expresión de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto	137
4.3.1 Amplificación de la región L1 de VPH18	138
4.3.2 Clonación dirigida en el vector pBacPAK9	139
4.3.3 Obtención y análisis de baculovirus recombinantes	139
4.3.4 Estudio de la cinética de expresión de la proteína Δ N6118VLP	141
4.3.5 Producción y purificación de VLPs de VPH18	145
5. DISCUSIÓN	157
5.1 Introducción.....	157
5.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes de L1 de VPH18 en <i>E.coli</i>.....	158
5.2.1 Diseño de las construcciones	158
5.2.2 Optimización de la expresión	159
5.2.3 Caracterización inmunológica de las proteínas recombinantes	165
5.3 Expresión de proteínas recombinantes de L1 de VPH18 en <i>P.pastoris</i>.....	173
5.3.1 Diseño de las construcciones	174
5.3.2 Ensayos de expresión	177
5.4 Expresión de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto.....	182
5.4.1 Diseño de la construcción	182
5.4.2 Optimización de la producción de VLPs	183
6. CONCLUSIONES	191
7. BIBLIOGRAFÍA	193
ANEXO 1	i
ANEXO 2	vii

ABREVIATURAS

A ₂₆₀ , A ₂₈₀ , A ₂₃₀	Absorbancia a 260, 280 y 230 nanómetros
AcMNPV	<i>Autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i> (virus de la polihedrosis nuclear múltiple de <i>Autographa californica</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AOX	Alcohol oxidasa
AP	<i>Alkaline Phosphatase</i> (Fosfatasa alcalina)
ARN	Ácido ribonucleico
ASC-US	<i>Atypical Squamous Cells of Unknown Significance</i> (Células escamosas atípicas de significado desconocido)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Colección Americana de Cultivos Tipo)
ATP	Adenosíntrifosfato
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-Fosfato
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CIN	<i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i> (Neoplasia cervical intraepitelial)
CIS	Carcinoma <i>in-situ</i>
CRPV	Cottonail Rabbit Papillomavirus (Papilomavirus del conejo silvestre)
DAB	Diaminobenzidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> (Dispersión Dinámica de Luz)
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
dNTPs	Desoxinucleótidos Trifosfato
ddNTPs	Dideoxinucleótidos Trifosfato
D.O. ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
DPBS	<i>Dulbecco's PBS</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Enzimoinmunoanálisis en fase sólida)
GST	Glutation-S-Transferasa
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Peroxidasa de Rábano)
HSIL	<i>High grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesión escamosa intraepitelial de alto grado)
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
LCR	<i>Long Control Region</i> (Región Larga de Control)
LSIL	<i>Low grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado)
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i> (Proteína de Unión a Maltosa)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> (Sitio de Clonaje Múltiple)
ME	Microscopía electrónica
MES	Ácido 2-morfolino etanosulfónico
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i> (Índice de Multiplicidad de la Infección)
MOPS	Ácido 4-Morfolinpropanosulfónico

Abreviaturas

Mut	<i>Methanol utilization</i> (Utilización del metanol)
Mut ⁺	<i>Methanol utilization plus</i> (Fenotipo silvestre para el gen <i>aox1</i>)
Mut ^s	<i>Methanol utilization slow</i> (Fenotipo mutante para el gen <i>aox1</i>)
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco de lectura abierto)
OPD	Dihidrocloreuro de O-Fenilendiamina
PAGE	<i>Poli-Acrylamide Gel Electroforesis</i> (Electroforesis en geles de poliacrilamida)
pb, Kpb	Pares de bases, Kilopares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
RNasa	Ribonucleasa
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SFB	Suero Fetal Bovino
SIL	<i>Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesión escamosa intraepitelial)
TEF	Factor de Elongación de la Transcripción
TEM	Microscopía electrónica de Transmisión
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletildiamina
T _m	Temperatura de <i>Melting</i> : temperatura a la que el 50% del ADN de doble cadena estará desnaturalizado
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i> (Región reguladora corriente arriba)
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1
VLPs	Partículas similares al virus
VP	Virus del Papiloma
VPB	Virus del Papiloma Bovino
VPH	Virus del Papiloma Humano
WB	<i>Western-blot</i>
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
X-GLUC	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónico

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

1.1.1 Historia

Las verrugas y su carácter infeccioso se conocen desde la antigua Grecia, si bien hasta el siglo XIX las verrugas genitales se consideraban como una forma de sífilis o gonorrea. La naturaleza viral de las verrugas humanas se determinó a principios del siglo XX (Ciuffo, 1907) y desde entonces se identificaron Virus del Papiloma (VP) en múltiples especies de vertebrados además de en los humanos.

El género *Papillomavirus* fue descrito por primera vez en el año 1930 por Richard Shope, quien caracterizó la naturaleza transmisible de los papilomas cutáneos que afectaban a los conejos silvestres (Shope & Hurst, 1933). Este VP, actualmente denominado CRPV (*Cottonail Rabbit Papillomavirus*), fue el primer virus oncogénico identificado.

En las décadas de los 50 y 60 se avanzó en el conocimiento sobre la diferenciación celular y la replicación viral. El desarrollo de la microscopía de inmunofluorescencia, y la mejora de la microscopía electrónica, permitió examinar la estructura de las partículas virales. El análisis de los papilomas producidos por el CRPV mostró que las partículas aparecían exclusivamente en el núcleo de queratinocitos diferenciados, en las capas superiores de las lesiones. La naturaleza crónica de los papilomas indicaba que el virus debía estar presente también en las capas basales, por lo que la ausencia de partículas virales en éstas llevó a inferir que el virus podía estar en una forma inmadura. Además se dedujo que la replicación de los VPs estaba estrechamente ligada al proceso de diferenciación de las células epiteliales escamosas.

Desde los años 70 hasta el inicio de los años 90 se produjo el desarrollo de la genética viral y con ella la emergencia de los virus del papiloma humano (VPH) como virus de importancia médica. El desarrollo de las técnicas de clonaje molecular permitió superar parte de las limitaciones experimentales que presentaba el estudio de los VPs, lo que condujo a la renovación en el interés por estos virus. En esta época se clonó el genoma completo del virus del papiloma bovino tipo 1 (VPB1) (Chen *et. al*, 1982), y a continuación se clonaron los genomas del VPH tipo 1 (Danos *et al.*, 1982) y del VPH tipo 6 (Schwarz *et al.*, 1983), identificándose las regiones reguladoras y las funciones de los diversos genes virales. Un avance digno de destacar, fue el reconocimiento de la

existencia de diversos genotipos del VPH: unos que inducían verrugas cutáneas, otros que se asociaban con la epidermodisplasia verruciforme (EV) y otros responsables de verrugas genitales (Gissman & zur Hausen, 1980).

Los estudios llevados a cabo por Orth y colaboradores fueron los que mostraron que algunas lesiones de EV progresaban hacia carcinomas de células escamosas (Orth *et al.*, 1978). El análisis de estos tumores reveló que la gran mayoría contenía dos genotipos de VPH (VPH5 o VPH8). Estos descubrimientos fueron los primeros que pusieron claramente de manifiesto que el VPH estaba implicado en tumores en humanos. Las primeras evidencias de la relación entre los VPH genitales y el cáncer cervical fueron descritas por zur Hausen en el año 1981 (zur Hausen *et al.*, 1981). Los primeros tipos genitales aislados fueron los tipos 6 y 11 (de Villiers *et al.*, 1981), presentes en verrugas genitales. A continuación se aislaron los tipos 16 (Durst *et al.*, 1983) y 18 (Boshart *et al.*, 1984) los cuales se detectaban en la mayor parte de los cánceres de cuello uterino, implicándose así definitivamente a los VPHs en los cánceres humanos. Además se determinó la existencia de VPH genitales de “alto riesgo”, implicados en cáncer, y de “bajo riesgo” no implicados.

1.1.2 Clasificación taxonómica

Inicialmente los virus del papiloma se incluyeron, junto con los poliomavirus, dentro de una misma familia, la familia *Papovaviridae*, debido a que ambos son virus con genomas de ADN circular de doble cadena, y con cápsidas icosaédricas sin envuelta (Bernard, 2005). Dado que posteriormente se ha visto que los dos grupos de virus tienen genomas de distinto tamaño, organizaciones genómicas completamente diferentes y poca similitud de secuencia, han sido recientemente reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus como familias separadas, *Papillomaviridae* y *Polyomaviridae* (de Villiers *et al.*, 2004).

La familia *Papillomaviridae* comprende una serie de virus específicos de hospedador, que han sido detectados en muchas especies animales, así como en humanos (Burd, 2003). Se han descrito más de 200 papilomavirus, identificándose alrededor de 100 tipos específicos de humanos (de Villiers *et al.*, 2004), de los cuales al menos 30 son capaces de infectar la mucosa genital.

Los Virus del Papiloma Humano se clasifican de acuerdo a las diferencias de secuencia en el gen *L1* que codifica la proteína mayoritaria de la cápsida (L1). Se trata de un gen bien conservado entre todos los miembros de la familia *Papillomaviridae*.

Así se habla de género de VPH, cuando existe menos de un 60% de homología, de especie entre 60 y 70%, de tipo entre 71 y 89%, de subtipo entre 90 y 98% y de variante cuando existe más de un 98% de homología en la secuencia del gen que codifica la proteína L1.

Los VPs se dividen en 16 géneros, denominados con una letra del alfabeto griego (Figura 1.1). Según esta clasificación, los VPHs se agrupan dentro de 5 de éstos: alfa, beta, gamma, mu y nu. Los tipos de VPH asociados con el cáncer cervical, denominados tipos de alto riesgo, pertenecen al género alfa-papilomavirus y se encuentran en las especies 5, 6, 7, 9 y 11 (Schiffman *et al.*, 2005). El VPH16 es el tipo que se encuentra con mayor frecuencia en los casos de cáncer cervical, perteneciendo a la especie 9, mientras que el siguiente tipo más común, el VPH18, es un miembro de la especie 7. El VPH6, responsable de la mayoría de las verrugas genitales, pertenece a la especie 10.

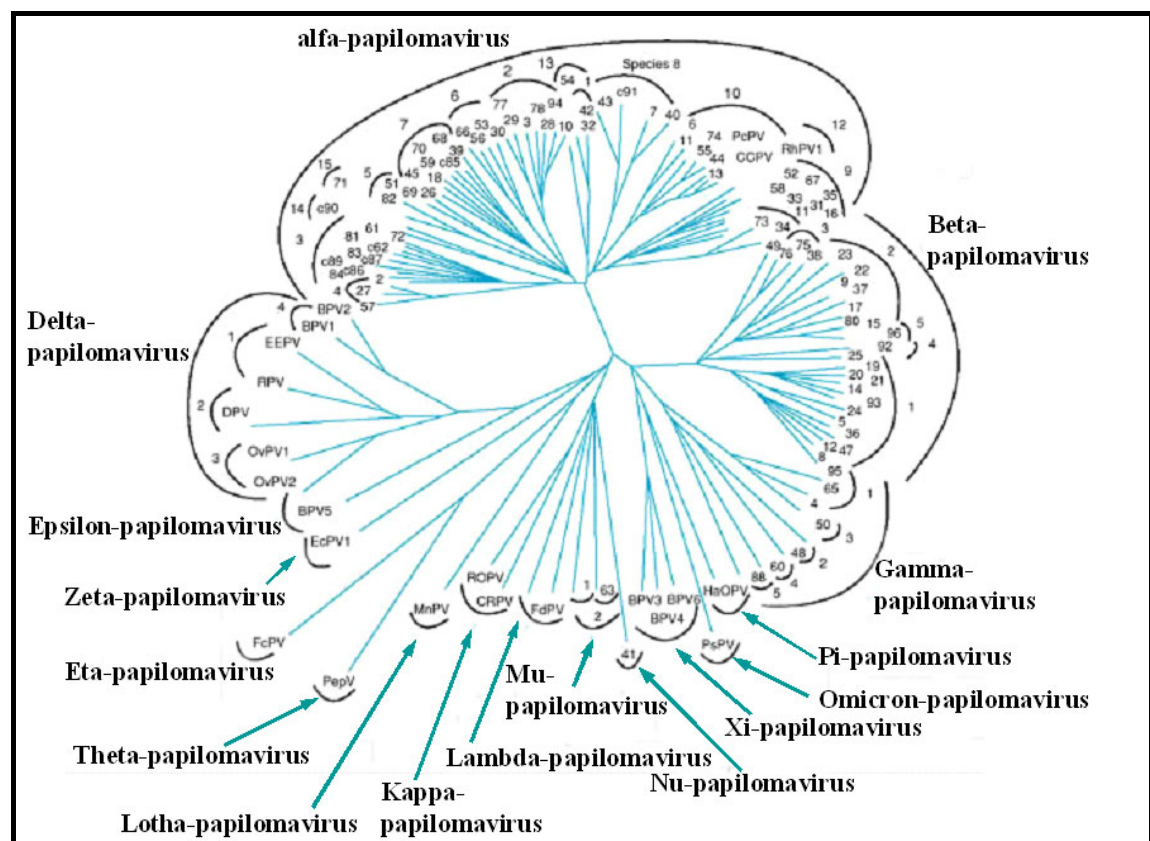


Figura 1.1. Árbol filogenético de los virus del papiloma basado en el ORF de L1. El número al final de cada rama indica un tipo de VPH (modificado de deVilliers *et al.*, 2004).

1.1.3 Clasificación epidemiológica

Como ya se ha mencionado, existen al menos 30 VPH, pertenecientes al género de los alfa-papilomavirus, que infectan la mucosa genital. Éstos se han clasificado en

dos grandes grupos en función de su asociación epidemiológica con el cáncer cervical: alto y bajo riesgo (Bosch *et al.*, 1995). Aproximadamente un tercio de los VPH de epitelio mucoso (18 tipos) han sido clasificados epidemiológicamente como tipos de alto riesgo, estando relacionados con el desarrollo de cáncer invasivo y con sus lesiones precursoras denominadas lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) de alto y bajo grado (Franco, 1996; Muñoz *et al.*, 2003). Entre éstos se encuentran los tipos 16 y 18 que son los más prevalentes en todo el mundo, encontrándose en más del 70% de los cánceres cervicales (Muñoz *et al.*, 2004). Doce VPH mucosos han sido clasificados como tipos de bajo riesgo los cuales están asociados a estados asintomáticos o a lesiones benignas tales como cervicitis no específica, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado o verrugas genitales (Tabla 1.1).

	Tipos de VPH
ALTO RIESGO	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26, 53, 66, 73
BAJO RIESGO	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108

Tabla 1.1: Clasificación epidemiológica de los VPHs mucosotrópicos (Muñoz *et al.*, 2003).

1.1.4 Estructura del virus

Los VPH son virus pequeños, desnudos con una estructura icosaédrica compuesta por 72 capsómeros pentaméricos agrupados en una organización triangular T=7 (Baker *et al.*, 1991; Touzé *et al.*, 2000). Las partículas virales presentan un diámetro de 52-55 nm (Figura 1.2, A). El análisis estructural mediante crio-microscopía electrónica empleando reconstrucciones tridimensionales, revela que los *Papillomavirus*, como en el caso de los *Polyomavirus*, están formados por dos tipos de capsómeros: 60 hexavalentes, que contactan con 6 capsómeros vecinos y 12 pentavalentes que contactan con 5 capsómeros vecinos (Figura 1.2, B).

La cápsida viral está constituida por dos proteínas estructurales. La proteína mayoritaria de la cápsida (L1) tiene un peso molecular de aproximadamente 55KDa, y representa el 80% del total de proteína viral. La proteína minoritaria de la cápsida (L2) tiene un peso molecular de aproximadamente 70 KDa, y se piensa que juega un papel de soporte entre los 72 pentámeros de la proteína L1.

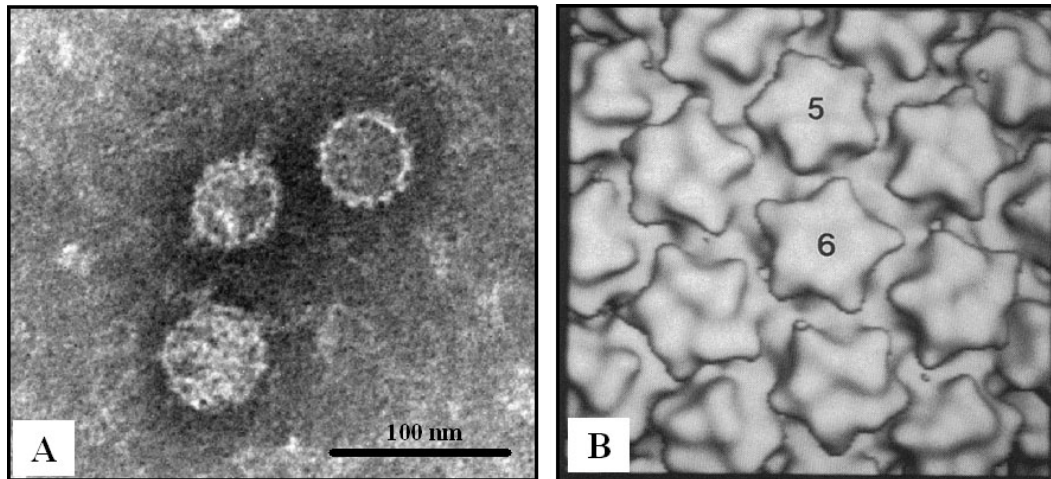


Figura 1.2. (A) Microscopía electrónica de partículas similares al virus (VLPs) de VPH16 (50-55 nm) producidas en células de insecto. (B) Reconstrucción tridimensional de la superficie del virus del papiloma bovino-1 (VPB1). Se señalan los pentámeros heptavalentes (5) rodeados por 5 pentámeros vecinos, y hexavalentes, rodeados por 6 pentámeros.

1.1.5 Organización genómica

Los VPs contienen un genoma de ADN circular de doble cadena, de aproximadamente 8000 pb de longitud (Danos *et al.*, 1982), que está asociado con histonas para formar un minicromosoma (Schäfer *et al.*, 2002).

Una característica común a la organización genómica de todos los VPs es que la totalidad de los marcos abiertos de lectura se localizan en una de las hebras del ADN viral, que es la que servirá como molde para la transcripción.

El genoma está organizado en tres regiones (Figura 1.3):

- 1) Región temprana: contiene los marcos de lectura abiertos para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Estos genes son los primeros en expresarse durante el ciclo viral, sólo en el epitelio basal, parabasal e intermedio. Están relacionados con la replicación viral (E1, 2, 4 y 5) y con la estimulación de la división celular (E6 y E7), que puede conducir a la oncogénesis.
- 2) Región tardía: codifica las proteínas estructurales L1 y L2, que se expresan al final del ciclo viral, sólo en células superficiales.
- 3) Región no codificante: también conocida como LCR (*Long Control Region*) o URR (*Upstream Regulatory Region*). Presenta de 400 a 1000 pb de longitud en función del tipo de VPH, y parece implicada en la regulación de la replicación del ADN viral. Posee tres regiones: (i) el segmento 5' que contiene señales de terminación de la transcripción; (ii) la región central, flanqueada por regiones de

unión para E2 que contienen potenciadores específicos del epitelio; (iii) el extremo 3' que contiene también una región de unión a E2 y el promotor de los genes E6/E7.

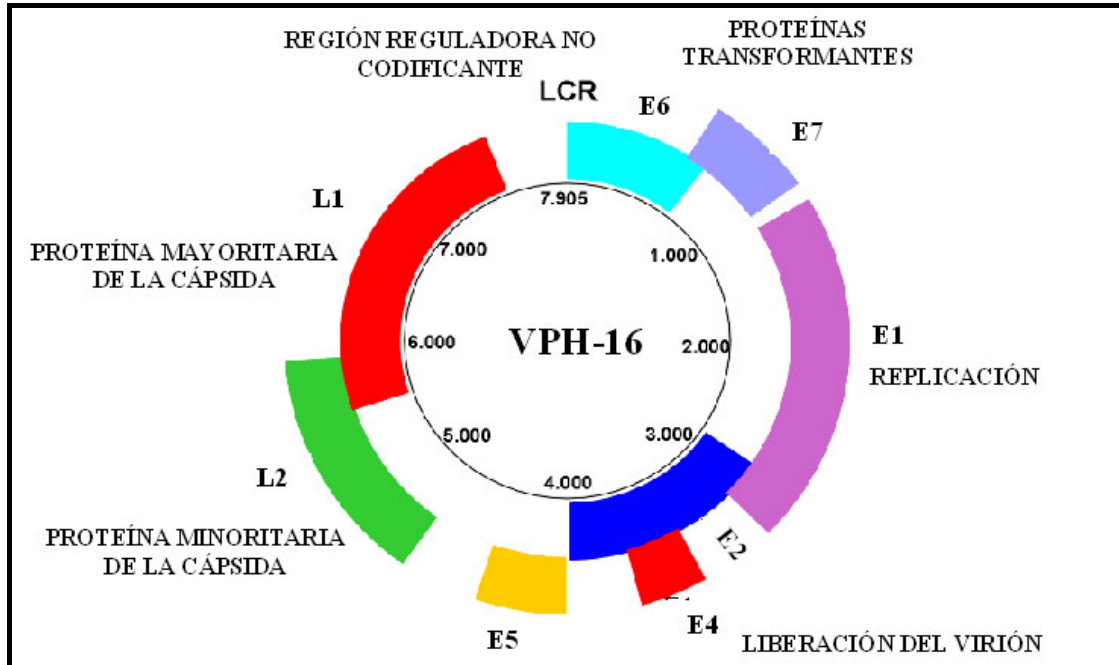


Figura 1.3. Mapa genético del VPH. Posee un genoma de ADN circular de doble hélice de aproximadamente 8.000 pb.

1.1.6 Ciclo viral

Los VPs son altamente específicos de la especie a la que infectan y presentan un tropismo muy definido por las células epiteliales escamosas infectando las células basales probablemente a través de heridas o abrasiones de la piel o las mucosas, aunque también se cree que algunos VPs infectan en lugares donde el acceso a capas basales se facilita de forma natural, como por ejemplo en la base del folículo piloso o la zona de transformación. Los mecanismos de unión y entrada en la célula aún son objeto de investigación. La integrina α -6 fue la primera proteína candidata como receptora para los VPs (Evander *et al.*, 1997). Esta integrina se expresa fundamentalmente durante la curación de heridas, lo cual la convierte en una candidata lógica (Stubenrauch & Laimins, 1999). Los VPs también se pueden unir a heparán sulfato, y glucosaminglucanos de la superficie celular (Boursaghin *et al.*, 2003). La unión estaría mediada por los 15 últimos aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la proteína L1 (Joyce *et al.*, 1999). Los viriones entran en la célula por endocitosis mediante una vía dependiente de clatrina (Kamper *et al.*, 2006). La descapsidación de la partícula tiene

lugar en el endosoma, liberándose el genoma y las proteínas de la cápsida en las vesículas endocíticas. Parece que la proteína L2 podría potenciar la importación del genoma viral hacia el núcleo, así como su localización en el dominio nuclear transcripcionalmente activo. Se ha demostrado además que la región C-terminal de L2 media la salida del endosoma (Kamper *et al.*, 2006).

Tras la infección y la entrada del ADN viral al núcleo de la célula, el genoma del virus se establece como elemento extracromosómico (episoma) y el número de copias se incrementa hasta las 50-100 por célula. El ADN viral se distribuirá entre las células hijas, y se postula que al mantenerse en bajo número de copias, impedirá la activación de la respuesta inmune (Rivera *et al.*, 2006). Durante la infección productiva, apenas existe detección de proteínas virales en las capas basales, aunque la proteína E7 puede ser detectada en la neoplasia cervical, donde los niveles de expresión no son controlados adecuadamente (Doorbar, 2007). Las células basales proliferativas migrarán a los estratos parabasal e intermedio, iniciando el programa de diferenciación y con él la transcripción de los distintos genes virales tempranos, regulada a través de la región LCR. Durante este periodo el ADN replicará hasta cientos de copias por célula, gracias a las proteínas E6 y E7 que bloquearán la salida de las células del ciclo celular (proceso normal durante la diferenciación). El mecanismo por el que el proceso de diferenciación activa el ciclo viral productivo es un área de alto interés. El modelo más aceptado considera que tiene lugar por la activación del promotor tardío, mediada por factores de transcripción dependientes de la diferenciación, que tiene como consecuencia la amplificación del ADN viral, así como la expresión de altos niveles de proteínas necesarias para la replicación, que incluyen E1, E4 y E5, siendo E4 la más abundante. Se ha sugerido que la expresión continua de E7 en un ambiente con abundante E4 lleva al mantenimiento de la célula en fase S, lo que permite la acumulación del genoma viral. Finalmente, las dos proteínas de la cápsida (L1 y L2), se expresan sólo en células que han sufrido la amplificación viral vegetativa. Al final del ciclo productivo, los genomas se encapsidarán, generándose viriones que se liberarán con el desprendimiento de las células en las capas superiores del epitelio mucoso.

La infección del cérvix por VPH, puede tener distintas consecuencias. En la mayoría de los casos, tras la infección productiva tiene lugar la regresión y clarificación de la misma, o bien el mantenimiento de los genomas virales como episomas en las capas basales. Sin embargo, en los casos de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL, apartado 1.2) el ciclo productivo tiene lugar sólo en cierta medida, de

forma que las células replicativas aparecen en todo el tercio inferior del epitelio. En las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado precursoras del cáncer (HSIL), estas células se encuentran hasta en las capas superiores, siendo detectables incluso en la superficie del epitelio. Se trata de lesiones que presentan infecciones abortivas, en las que la expresión de los genes virales no está adecuadamente regulada, de forma que no tienen lugar los eventos tardíos del ciclo celular. Los fenómenos moleculares que hacen que una lesión productiva progrese a neoplasia y finalmente a cáncer son desconocidos, pero parece que están relacionados con cambios en la expresión de los genes virales, en particular, con un aumento de la expresión de E6 y E7. El desarrollo de cáncer cervical, requiere además una desregulación continua de estos oncogenes virales, que se verá facilitada por la integración del ADN del VPH en el cromosoma de la célula hospedadora.

No obstante existen múltiples estudios que demuestran además la presencia de ADN de VPH en ausencia de cambios morfológicos en las células, considerándose por tanto la existencia de un estado latente. Por ejemplo, la aparición de recurrencias rápidas y consistentes tras la eliminación de tejidos infectados en procesos de papilomatosis laríngea, apoyaría este estado (Ferenczy *et al.*, 1985). En la infección latente el virus se mantendrá en forma de episoma, siendo necesarios factores exógenos o endógenos para que se inicie la fase productiva (de Villiers, 1998).

1.1.7 Transcripción y expresión de proteínas virales

Como ya se ha indicado, la fase replicativa de los VPs está estrechamente unida al programa de diferenciación celular. La transcripción es un proceso complejo debido a la presencia de múltiples promotores, sitios de procesamiento múltiples, y producción diferencial de especies de ARNm en distintas células. En el VPB1, se han identificado hasta 7 promotores distintos y más de 20 especies de ARNm diferentes.

En los VPH de alto riesgo, existen dos promotores principales, cuya expresión está regulada por la diferenciación celular (Wooldridge & Laimins, 2008). El promotor temprano controla la expresión en células no diferenciadas y dirige la iniciación de la transcripción viral en regiones localizadas corriente arriba del marco de lectura abierto (ORF) para E6. La expresión a partir de este promotor genera transcritos policistrónicos, que codifican las proteínas E6, E7, E1, E2, E4 y E5, que terminan en regiones de poliadenilación localizadas corriente abajo del ORF para E5 (ver Figura 1.4). Este promotor se denomina P₉₇ en VPH31 y es análogo al promotor P₉₇ de VPH16 y P₁₀₅ de

VPH18. Se regula mediante factores de transcripción que se unen a secuencias de inicio de la región reguladora (LCR) (Howley & Lowy, 2007).

El promotor tardío, denominado P₇₄₂, dirige la expresión de los transcritos que codifican las proteínas tardías, incluyendo E1, E4, E5, L1 y L2. Estos transcritos se activan durante la diferenciación, iniciándose en diferentes regiones localizadas alrededor del nucleótido 742 en VPH31 (Wooldridge & Laimins, 2008). Se han identificado secuencias en la región E6/E7 así como en la región LCR que regulan este promotor tardío (Bodily & Meyers, 2005; Spink & Laimins, 2005). También se han identificado varios promotores secundarios en las regiones E6/E7 que son activados durante la diferenciación (Ozbun & Meyers, 1998).

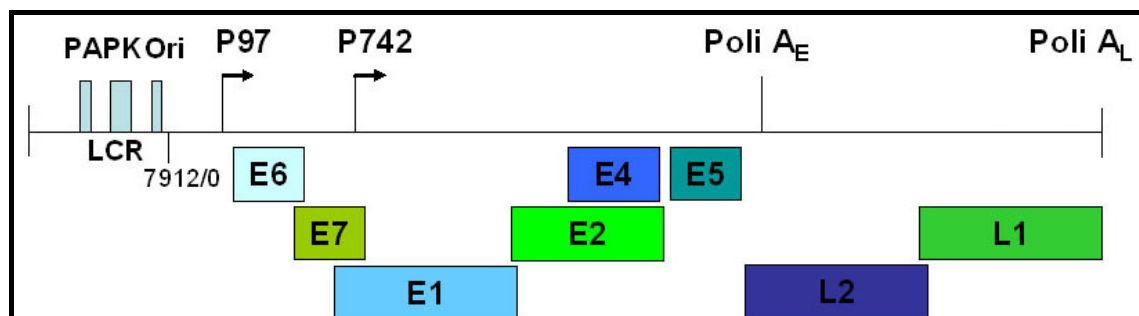


Figura 1.4. Mapa linealizado del genoma de VPH31. Se representan los promotores temprano (P97) y tardío (P742), las regiones de poliadenilación de transcritos tempranos y tardíos (PoliA_E y Poli A_L respectivamente), así como el origen de replicación y los potenciadores (PA: potenciador auxiliar, PK: potenciador específico de queratinocitos).

a) Proteína reguladora E2

Tras la infección, las primeras proteínas que se expresan son las proteínas de replicación viral E1 y E2. La proteína E2 presenta una función reguladora bien caracterizada, que afecta a la transcripción, la replicación y el mantenimiento de episomas. El mecanismo por el cual E2 estimula la transcripción, aún no está claro, aunque se cree que la activación es el resultado de la interacción de E2 con algunos componentes de la maquinaria de transcripción.

En esta proteína se pueden distinguir dos dominios altamente conservados entre todos los VPs: (a) un dominio de unión específica a ADN y de dimerización localizado en la región carboxi terminal y (b) un dominio de transactivación localizado en la mitad amino-terminal de la proteína. Ambos están separados por una región en bisagra, que es variable entre los diferentes VPs (McBride *et al.*, 1991)

La proteína E2 se une a secuencias consenso (ACCN₆GGT) denominadas E2BS (*E2 binding sequence*), en forma de dímero. En el caso de los VPH, la unión de la proteína E2 a los E2BS actúa como moduladora de la transcripción viral. Se han descrito 4 E2BS situados corriente arriba del promotor temprano (P₉₇ o P₁₀₅), cuya actividad basal es reprimida por la proteína E2 completa (Howley & Lowy, 2007).

Además la proteína E2 completa presenta un papel crítico en la replicación del ADN viral, dirigiendo a la proteína E1 hacia el origen de replicación. También se precisa para el mantenimiento del genoma viral en forma de episoma, en las células replicativas. En presencia de esta proteína, los plásmidos virales que contienen sitios de unión para E2, se asocian con los cromosomas mitóticos. E2 interacciona simultáneamente con la cromatina mitótica y con los genomas virales, asegurando que los episomas sean empaquetados en la envuelta nuclear cuando se reconstruye en la telofase, y facilitando la segregación del genoma viral en las células hijas.

b) Proteína E1

La proteína E1 es una fosfoproteína que se une de forma específica al origen de replicación, unión que es estabilizada a través de la interacción con E2.

Presenta actividad adenosíntrifosfatasa y helicasa, y se precisa para la iniciación y la elongación de la síntesis del ADN viral (Liu *et al.*, 1995). Se ha mostrado que interacciona con proteínas celulares, entre las que se encuentran la subunidad p180 de la ADN polimerasa, y probablemente de ese modo reclute la maquinaria de iniciación de la replicación celular en el origen de replicación viral. Se han descrito muchos otros factores celulares capaces de interactuar con E1, si bien el significado fisiológico de estas interacciones no está totalmente claro (Cueille *et al.*, 1998).

c) Proteína E4

Se trata de una proteína que, aunque se expresa a niveles basales en la fase temprana, los mayores niveles se detectan en las células diferenciadas, en los estados tardíos de la infección. Como ya hemos mencionado, parece que esta proteína, mediante asociación con ciclinas dependientes de kinasas y con E2, puede modular la actividad del promotor temprano, regulando así la expresión de E7 y por tanto la entrada en fase S (Doorbar, 2007).

Por otro lado, el 30% del contenido protéico de la célula infectada parece estar constituido por un híbrido E1^{E4} (primeros 4 aminoácidos de E1 y E4) (Rivera *et al.*, 2006), que forma complejos hexaméricos que se unen a la red de citoqueratina de la célula, provocando su desestabilización, situación que ayuda a la salida de los viriones de la célula infectada (Motoyama *et al.*, 2004). Además también altera el potencial de la membrana mitocondrial, y la estabilidad de los ribosomas. Por todos estos mecanismos, la célula perderá soporte estructural, sufriendo daño mitocondrial y apoptosis, que permitirán una mayor diseminación de la progenie viral, siempre que las proteínas de la cápsida hayan sido sintetizadas (Rivera *et al.*, 2006).

d) Proteína E5

E5 es una pequeña proteína de naturaleza hidrofóbica. Parece presentar un efecto estimulador del crecimiento, mediante mecanismos bioquímicos no muy bien conocidos, pero que deben implicar interacciones con el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) o con la subunidad de 16 KDa de la ATPasa vacuolar (Conrad *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 2005).

El gen *e5* no se expresa en la mayoría de los cánceres por VPH, lo cual sugiere que este gen estimula la proliferación celular *in vivo* en los papilomas benignos y no en los cánceres. Además algunos estudios implican a E5 en la regulación a la baja de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII) (Zhang *et al.*, 2003).

e) Proteínas E6 y E7

En los tipos de VPH de alto riesgo, las oncoproteínas virales E6 y E7 se expresan a partir de ARNs mensajeros policistrónicos.

Se han descrito una serie de interacciones entre la proteína E6 de alto riesgo y proteínas de la célula hospedadora, que proporcionan algunas claves para la comprensión de las funciones como oncoproteínas virales (zur Hausen, 2000). La proteína E6 ejerce su papel transformante principalmente mediante la unión a la proteína celular p53 a través de la proteína ligasa E6-AP (*E6-Associated Protein*) (Huibregtse *et al.*, 1991; 1993). Esta interacción da lugar a la unión de moléculas de ubiquitina a p53, que entonces será reconocida y degradada por el proteosoma 26S.

La proteína p53 se activa cuando el ADN celular sufre algún daño, uniéndose a él e induciendo así la expresión del gen que codifica la proteína p21 (ver Figura 1.5). Dicha proteína es un inhibidor de ciclinas dependientes de kinasas (CDK), que se une a los complejos de ciclina G1 con proteína CDK2, la cual conduce a la célula más allá del punto de control G1 del ciclo celular. La proteína p21 bloquea la actividad kinasa de estos complejos, evitando así la progresión de la célula en fase S y la replicación de su ADN. Las células no podrán progresar en la fase S del ciclo celular y se retrasarán en la fase G1 o morirán por apoptosis. Por tanto, la degradación de p53 tiene como consecuencia la evasión del punto de control del ciclo celular G1/S, dando lugar a la fragmentación y reunión de los cromosomas, generando un cariotipo altamente inestable. Esto puede conducir a duplicaciones génicas y, en los siguientes ciclos de división, a amplificaciones génicas.

Pero las funciones de la proteína E6 son mucho más amplias ya que puede provocar estabilización de la tirosín-kinasa Blk (de la familia src) estimulando la actividad mitótica o bien estimular la telomerasa de la célula hospedadora (Oh *et al.*, 2001), cuya activación puede observarse en muchos cánceres de humanos, incluyendo los debidos a la infección con VPH.

En los VPH de bajo riesgo, la proteína E6 es capaz de unirse a p53 pero con baja afinidad.

La proteína E7 presenta capacidad de unirse a la proteína pRb perteneciente a la familia de las proteínas supresoras de tumores del retinoblastoma y a otras proteínas relacionadas, provocando su fosforilación e incrementando por tanto su degradación por adición de moléculas de ubiquitina.

La proteína pRb permanece hipofosforilada (activa) en G₀ y G₁ y se hiperfosforila durante las fases S, G₂ y M. La forma hipofosforilada se une a un conjunto de proteínas reguladoras que favorecen la proliferación celular, manteniéndolas secuestradas y fuera de acción. La fosforilación de pRb mediada por E7, da lugar a la liberación de factores de transcripción de la familia E2F (Factor de Elongación 2), activándose la transcripción de genes que regulan la proliferación celular. Todo esto se traduce en la entrada en fase S del ciclo celular, inducida por E7 (Howley & Lowy, 2007) (Figura 1.5).

Otra función importante de la proteína E7 es la inactivación de los inhibidores de las ciclinas dependientes de kinasas p21 y p27. Esta interacción desacopla la actividad

CDK de sus inhibidores y debe ser una de las principales causas de la estimulación del crecimiento de las células infectadas con VPH.

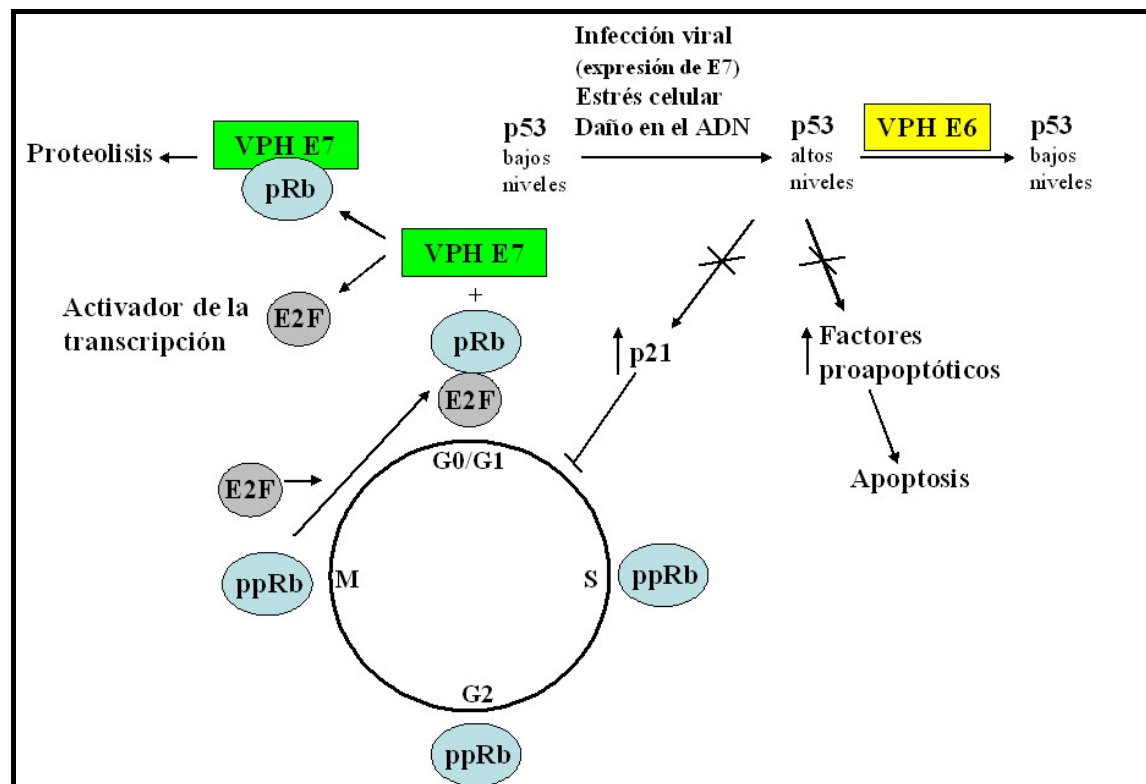


Figura 1.5. Esquema del papel de las proteínas p53 y pRb en la regulación del ciclo celular.

Finalmente, la proteína E7 en los VPH de alto riesgo, genera inestabilidad cromosómica en células humanas normales. Induce defectos en los puntos de control G1/S, así como desacoplamiento de la síntesis de centrosomas durante el ciclo de división celular (Munger *et al.*, 2004). Esto lleva a la formación de mitosis multipolares anormales y segregación incorrecta de los cromosomas así como aneuploidias. Además, parece que esta proteína también es capaz de generar aberraciones cromosómicas estructurales.

De forma semejante a E6, en los VPH de bajo riesgo la proteína E7 se une a pRb pero con una afinidad 10 veces menor.

Parece que las proteínas E6 y E7 de bajo riesgo juegan papeles fundamentales en el mantenimiento del ADN del virus en forma de episoma en el interior de la célula hospedadora (Oh *et al.*, 2004). Por otro lado, las proteínas E1 y E2 son necesarias para la iniciación de la replicación viral, pero aún así, ésta es totalmente dependiente de factores celulares, como la ADN polimerasa A, timidín kinasa, y otros. Estas proteínas normalmente sólo se expresan en fase S, durante la replicación del ADN celular en las

células basales del epitelio, que se encuentran en división. Sin embargo, la replicación vegetativa del ADN de los VPs, sólo ocurre en las células más diferenciadas del epitelio, que no se encuentran en división. De este modo, los VPs han desarrollado mecanismos para activar los genes celulares necesarios para la replicación de su ADN en células que de otra forma permanecerían quiescentes. Estos mecanismos deben estar mediados por la proteína E7 y su capacidad para liberar el factor E2F. Además, E7 crea una señal que incrementa los niveles de p53. Este incremento es contrarrestado por E6 que promueve la degradación de p53, permitiendo la activación de los genes de replicación celulares dependiente de E7, necesaria para la replicación del ADN viral.

f) Proteína L2

La proteína minoritaria de la cápsida (L2) tiene un tamaño de aproximadamente 473 aminoácidos. Parece que es necesaria para que se produzca la infección, interaccionando con receptores en la membrana de la célula hospedadora, y también parece que participa en la liberación y conducción del ADN viral hacia el núcleo (Roden *et al.*, 2001). L2 presenta mayores variaciones de secuencia que L1, de forma que se estudia si su utilización como antígeno en vacunas podría proteger frente a distintos tipos de VPH. Además, como se ha comentado en el apartado 1.1.6, parece que juega un papel esencial en la salida del ADN viral de los endosomas para ser conducido al núcleo celular.

g) Proteína L1

La proteína mayoritaria de la cápsida (L1) presenta aproximadamente 530 aminoácidos. Está altamente conservada entre las diferentes especies de VPs, por lo que ha sido utilizada para detectar la presencia de proteínas de la cápsida en tejidos humanos. La cápsida viral está constituida por 360 copias de la proteína L1 que se agrupan en 72 capsómeros pentaméricos, y contiene además 12 copias de la proteína minoritaria (L2), que se localizan en el centro de los 12 capsómeros pentavalentes (Trus *et al.*, 1997). Además, parece que la proteína L1 cumple un papel esencial en la unión al ADN viral y su empaquetamiento (Florin *et al.*, 2002, Schäfer *et al.*, 2002), especialmente los 9 aminoácidos del extremo C-terminal (Touzé *et al.*, 2000).

La proteína L1, cuando es expresada en sistemas heterólogos, presenta la capacidad de autoensamblarse en forma de partículas similares al virus (VLPs, *Virus Like Particles*) en ausencia de la proteína L2, si bien ésta puede integrarse en las VLPs

cuando se coexpresa con L1 (Florin *et al.*, 2002). Estas partículas son morfológica e inmunológicamente muy semejantes a los viriones nativos aunque se trata de partículas no infecciosas por carecer de ADN, por lo que han constituido la base para el desarrollo de vacunas profilácticas frente a la infección con VPs. Además, la proteína L1 también se puede ensamblar en estructuras constituidas por 12 pentámeros y que son denominadas VLPs pequeñas, que presentan una triangulación T=1 (Chen *et al.*, 2000).

La estructura primaria y secundaria de la proteína L1, se muestra en la Figura 1.6. En ella se observa que los primeros 382 aminoácidos (residuos 20 a 382) se pliegan fundamentalmente en forma de 12 β -láminas (nombradas de B a J). Las proyecciones laterales del extremo C-terminal están constituidas fundamentalmente por α -hélices (h1 a h5). Tres de estas hélices (h2 a h4) son las responsables de establecer contacto con los otros monómeros, en tanto que una pequeña β -lámina (β J) y la última hélice (h5) retornan al núcleo del monómero original.



Figura 1.6. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los VPHs 16 y 18. Los elementos de la estructura secundaria identificados en VPH se representan en forma de flechas (β -láminas) y barras rectangulares (α -hélices). En azul se representan las β -láminas, y la hélice 1, que es una hélice corta que forma parte del lazo E-F; en rosa se representan los lazos conectores; en amarillo se representan las α -hélices que forman parte del dominio C-terminal que se proyecta lateralmente. Modificada de Chen *et al.*, 2000.

Según el modelo propuesto por Chen y colaboradores, (Chen *et al.*, 2001), cada una de las subunidades monoméricas que constituyen el pentámero se disponen alrededor de un eje axial, dejando un hueco cónico que se abre al exterior a través de una estrecha garganta de 14 Å de diámetro. Como ya se ha mencionado anteriormente, los brazos C-terminales son los que forman los contactos interpentaméricos. La hélice h4 constituye el denominado brazo invasor que establecerá la unión con el pentámero adyacente. Las hélices h2 y h3 también están implicadas en estos contactos, adquiriendo

una forma de V invertida donde se acopla la región del extremo N-terminal de otro pentámero. Estas dos hélices se han descrito como esenciales para el plegamiento de la proteína L1 y la correcta formación de los pentámeros. Los capsómeros se unirán mediante interacciones hidrofóbicas entre la h4 de uno y la h2 y h3 del vecino (Bishop *et al.*, 2007). Cada capsómero recibirá 5 brazos invasores procedentes de cada uno de los pentámeros vecinos y donará 5 a los capsómeros adyacentes, en un patrón idéntico al descrito para los poliomavirus murinos y para el SV40 (Liddington *et al.*, 1991) (Figura 1.7). En estos contactos interpentaméricos se encuentran implicadas las cisteínas localizadas en las posiciones 175 y 428 (referidas a VPH16), que establecen puentes disulfuro con las cisteínas de los pentámeros vecinos estabilizando las cápsidas (Sapp *et al.*, 1995).

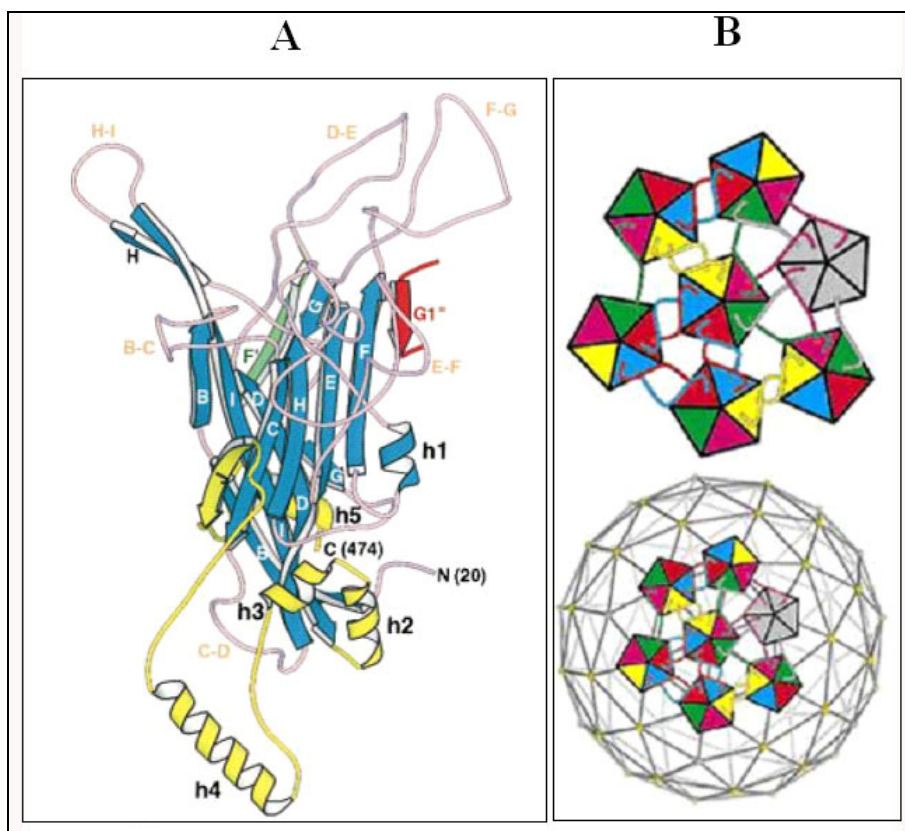


Figura 1.7. **(A)** Estructura terciaria del monómero de L1. Las β -láminas se señalan con las letras B a I, las α -hélices con las letras h1 a h5, y los lazos interlaminares con las letras B-C, C-D, D-E, F-G y H-I. Se señalan también los extremos C-terminal (C) y N-terminal (N). **(B)** Reproducción del modelo del brazo invasor, mediante el cual se establecen las uniones entre los pentámeros. Imágenes tomadas de Modis *et al.*, 2002.

Aceptando el “Modelo de ensamblaje cinéticamente limitado” relacionado con la teoría del ensamblaje de Zlotnick para virus con cápsidas que poseen estructuras icosaédricas (Zlotnick *et al.*, 1994; 1999), el proceso de ensamblaje constaría de dos

fases, una primera en la que se formaría el núcleo de la partícula, constituido por dímeros de capsómeros, y una segunda fase de la elongación rápida en la que se produciría la adición de pentámeros hasta la formación de la cápsida completa.

1.1.8 Patogenia

La mayoría de las infecciones con VPHs genitales son auto-limitadas, de forma que, de media, la infección clarificará en menos de 6 meses (Baseman & Koutsky, 2005). Muchos estudios confirman que la detección persistente de ADN de VPH de alto riesgo está asociada con un riesgo mayor de desarrollar lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) y cáncer (Schlecht *et al.*, 2001; Liaw *et al.*, 1999; Wallin *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 1998). La infección persistente puede representar un evento temprano relacionado con la inactivación de p53 y pRb como resultado de una expresión continua de E6 y E7, lo que genera una oportunidad para otros fenómenos que conduzcan al incremento de la desregulación del ciclo celular y la inestabilidad genética.

Para que se desarrolle una infección crónica parece que es preciso que el virus infecte células que posean capacidad proliferativa prolongada. Dado que las células proliferativas se localizan en las capas basales del epitelio, cuando éste es estratificado, la infección debe ocurrir a través de microtraumas de las capas superiores, que permitan al virus acceder a las capas inferiores. Una vez que la infección se ha establecido, las células basales portarán bajo número de copias de los genomas virales en forma episomal y presentarán bajos niveles de ARN viral.

Durante las infecciones de larga duración, los genes *e6* y *e7* parecen ser los principales conductores de la progresión hacia displasias de alto grado y cáncer, mediante una serie de cambios patogénicos. La integración del ADN viral, vía recombinación no homóloga, representa un paso clave que parece estabilizar los altos niveles de expresión de E6 y E7 y está asociado con lesiones más severas. Este fenómeno se detecta en un 5% a 16% de las lesiones HSIL y en un 87% de los casos de cáncer invasivo. La integración del genoma puede observarse en básicamente todos los tumores relacionados con el VPH18, y en la mayoría de los relacionados con el tipo 16 (Cullen *et al.*, 1991). Sucede en sitios frágiles del genoma, y lleva a la interrupción del episoma viral entre los genes *e1* y *e2* (Kalantari *et al.*, 2001; Thorland *et al.*, 2000). Esto

se traduce en una expresión constitutiva de las oncoproteínas virales debido a la pérdida de E2 que es la principal proteína represora (Park *et al.*, 1997).

Otro de los parámetros relacionados con la progresión hacia lesiones más graves, parece ser la carga viral. Generalmente, en las lesiones intraepiteliales escamosas prevalentes, se observa la presencia de mayor carga viral que en las infecciones que cursan con citología normal (Swan *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001; Healey *et al.*, 2001; Sherman *et al.*, 2002). Sin embargo, la relación entre carga viral y progresión hacia lesiones de mayor gravedad, es variable en función de la técnica que se emplee para valorar dicha carga.

Existen múltiples estudios que han demostrado que el riesgo de padecer cáncer cervical y SIL es mayor en mujeres infectadas con determinadas variantes no europeas de los VPHs tipo 16 y 18. Parece probable que estas diferencias en el potencial oncogénico sean debidas a múltiples factores. Algunos de éstos serían propiedades biológicas del virus como, variaciones en la región LCR que pueden afectar a la replicación y a la actividad de una o más proteínas, particularmente a E6 (Kammer *et al.*, 2000; Hubert, 2005). Otro factor también puede ser variaciones en la eficacia con la que E2 suprime la expresión de E6 y E7 (Ordoñez *et al.*, 2004).

Finalmente, varios estudios han coincidido en asociar distintos alelos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II con el cáncer cervical. Parece que existen alelos que confieren protección (DRB1-1301) o susceptibilidad (DQB1-0302) (Lin *et al.*, 2001).

1.1.9 Inmunidad

De los estudios realizados sobre modelos animales de infección con VPs se concluye que ambos tipos de respuestas inmunes (humoral y celular) tienen lugar tras la infección.

El examen histológico de los casos de verrugas que revierten espontáneamente, revela un abundante infiltrado de linfocitos T (CD4+ y CD8+) y de macrófagos, en el estroma de la verruga y en el epitelio. El entorno de citocinas está constituido por citocinas proinflamatorias como IL-2, TNF- α y IFN- γ . Además existe un aumento de moléculas de adhesión necesarias para el tráfico de linfocitos en el endotelio de los capilares de las verrugas. Se trata pues de una respuesta de tipo Th1. Las células T sistémicas son dirigidas hacia las proteínas tempranas E2 y E6, durante un periodo de tiempo limitado que coincide con el periodo de amplificación del ADN viral. Hay que

tener en cuenta que la infección por VPH no va acompañada de inflamación, por lo que no hay una señal obvia de daño celular que alerte al sistema inmune de la presencia del virus. Esto puede tener como resultado la aparición de una infección crónica, o que el hospedador “ignore” la presencia del patógeno durante largos periodos de tiempo (Stanley, 2006). Esto podría ser una explicación al tiempo relativamente largo necesario para clarificar una infección típica por VPH (Gravitt & Shah, 2004).

La ausencia de respuesta inflamatoria parece que tiene lugar por múltiples motivos. En primer lugar, no existe respuesta inmune innata, dado que la infección por VPH no desencadena lisis celular. Al no existir secreción de citocinas proinflamatorias, no se produce activación de células dendríticas, con lo que no se reclutarán células efectoras en el lugar de infección y/o su actividad será regulada negativamente (mediante regulación a la baja de la expresión de citocinas tales como el interferón α).

Por otro lado, los niveles de anticuerpos neutralizantes en suero, inducidos por la infección natural, alcanzan un pico durante la regresión de las verrugas (Ghim *et al.*, 2000). La evidencia de que existe inmunidad humoral proviene del hecho de que el 60% de las mujeres con infección por VPH6, 16 ó 18 sufrían seroconversión dentro de los primeros 18 meses tras la primera detección de ADN (Carter *et al.*, 2000). Los anticuerpos séricos de carácter neutralizante van dirigidos frente a epítomos conformacionales de la proteína L1, presentes en la superficie de la partícula viral intacta. Pero los niveles de anticuerpos en suero tras la infección natural son bajos incluso cuando alcanzan el pico (Villa *et al.*, 2005). Así, mujeres aparentemente seronegativas podrían presentar en realidad respuesta humoral, pero con niveles de anticuerpos por debajo del límite inferior detectable en el ensayo serológico empleado. El tiempo medio de seroconversión se sitúa entre 10-12 meses, sugiriendo una vez más que el virus puede permanecer “escondido” durante las fases tempranas de la infección.

Finalmente, también podríamos hablar de baja respuesta humoral, debido a que el principal antígeno viral, es decir la proteína L1, sólo se expresa en las capas superficiales del epitelio, alejadas de las células presentadoras de antígeno que se localizan fundamentalmente en las capas basales.

Las respuestas frente a proteínas tempranas son variables y podrían estar relacionadas con el estado de la infección. Dado que en las células cancerosas se producen las proteínas E6 y E7 en grandes cantidades, la presencia de anticuerpos anti-E6 y anti-E7 se asocia con progresión maligna de la enfermedad, y su detección es óptima en pacientes con cáncer cervical. Determinados estudios empleando como

antígenos proteínas recombinantes, han mostrado que el 50-60% de pacientes con cáncer cervical presentan anticuerpos anti-E6 y anti-E7 (Meschede *et al.*, 1998).

Por último cabe señalar que se han detectado anticuerpos en otros fluidos corporales tales como lavados vaginales o fluidos orales (IgG e IgA) cuyo valor para el estudio de la respuesta inmune aún no está claro (Marais *et al.*, 2001).

El aclaramiento de la infección se define como la ausencia de ADN detectable en el lugar inicial de la infección. No está claro si esto refleja el aclaramiento viral completo o el establecimiento de una fase latente, en la que el virus está presente pero es indetectable (Gravitt & Shah, 2004).

1.2 INFECCIÓN CLÍNICA CAUSADA POR VPH MUCOSOTRÓPICOS

1.2.1 Infecciones del tracto genital

Las infecciones del tracto genital afectan a la piel de los genitales, así como a las mucosas, incluyendo el tracto vaginal, cérvix y el canal anal. Se trata de una infección muy común, con un amplio rango de manifestaciones clínicas y resultados, que varían desde estados asintomáticos e infecciones autolimitadas, hasta infecciones persistentes asociadas con progresión maligna.

1.2.1.1 Lesiones escamosas intraepiteliales y cáncer de cérvix

El concepto y la clasificación de las alteraciones premalignas del epitelio cervical han ido cambiando a medida que se conocía su biología e historia natural. Inicialmente se hablaba de “carcinoma *in-situ*” (CIS) para referirse a las lesiones que afectaban al epitelio cervical. En 1949 Papanicolaou introdujo el término “displasia” para referirse a cambios epiteliales menos acusados. A principios de los 60, para unificar términos, se introdujo el concepto de neoplasia cervical intraepitelial (CIN) (Parkin, 2006; Walboomers *et al.*, 1999), clasificándose las lesiones en tres grados en función de la severidad de las mismas (I, II y III, de menor a mayor gravedad). Finalmente, debido a la baja reproducibilidad diagnóstica de esta clasificación, junto con los avances en el conocimiento de la carcinogénesis, en 1989 se impuso el Sistema Bethesda para describir las alteraciones citológicas, que fue modificado y revisado en el año 2001 (Solomon *et al.*, 2002). En él se sustituye el término neoplasia intraepitelial por el de lesión escamosa intraepitelial (SIL) con dos categorías: bajo grado (LSIL) y alto grado (HSIL). La categoría LSIL corresponde a infecciones víricas, generalmente

autolimitadas y que sólo excepcionalmente evolucionan a carcinoma, en tanto que las HSIL equivalen a verdaderos cambios premalignos que se corresponden con CIN2 (displasia moderada) y CIN3 (carcinoma in-situ). En las LSIL se pueden ver implicados tipos muy heterogéneos de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico, en tanto que en las HSIL se hallan sólo tipos de alto riesgo (Clifford *et al.*, 2005). Además se habla de ASC-US para referirse a alteraciones indeterminadas que no permiten descartar totalmente la presencia de una lesión intraepitelial pero tampoco son suficientes para diagnosticarla. En la Tabla 1.2 y la Figura 1.8 se muestran las equivalencias entre las diferentes clasificaciones.

Al inicio de la actividad sexual la mujer puede ser contagiada por un VPH de alto riesgo, pero en la mayoría de los casos, originará una infección transitoria indetectable en 6-12 meses. Ocasionalmente la infección dará lugar a una lesión, que normalmente revertirá de forma espontánea. Si el virus no desaparece y la infección por VPH persiste, la lesión precursora se mantendrá y cierto número de estas lesiones progresarán hacia HSIL, aumentando así el riesgo de progresión hacia cáncer invasor (Bosch *et al.*, 2006). Dado que las lesiones precursoras del cáncer se desarrollan durante periodos prolongados, y dado que se detectan fácilmente mediante citología, dichas lesiones podrán ser tratadas adecuadamente para prevenir así el desarrollo de carcinoma invasor (Galceran *et al.*, 2006).

Displasia	CIN	Bethesda
Normal	Normal	Normal
Atipia neoplásica o reactiva	Atipia	ASC-US
Displasia leve	CIN 1	SIL de bajo grado (LSIL)
Displasia moderada	CIN 2	SIL de alto grado (HSIL)
Displasia severa	CIN 3	
CIS		

Tabla 1.2. Clasificación de las lesiones premalignas de cuello uterino.

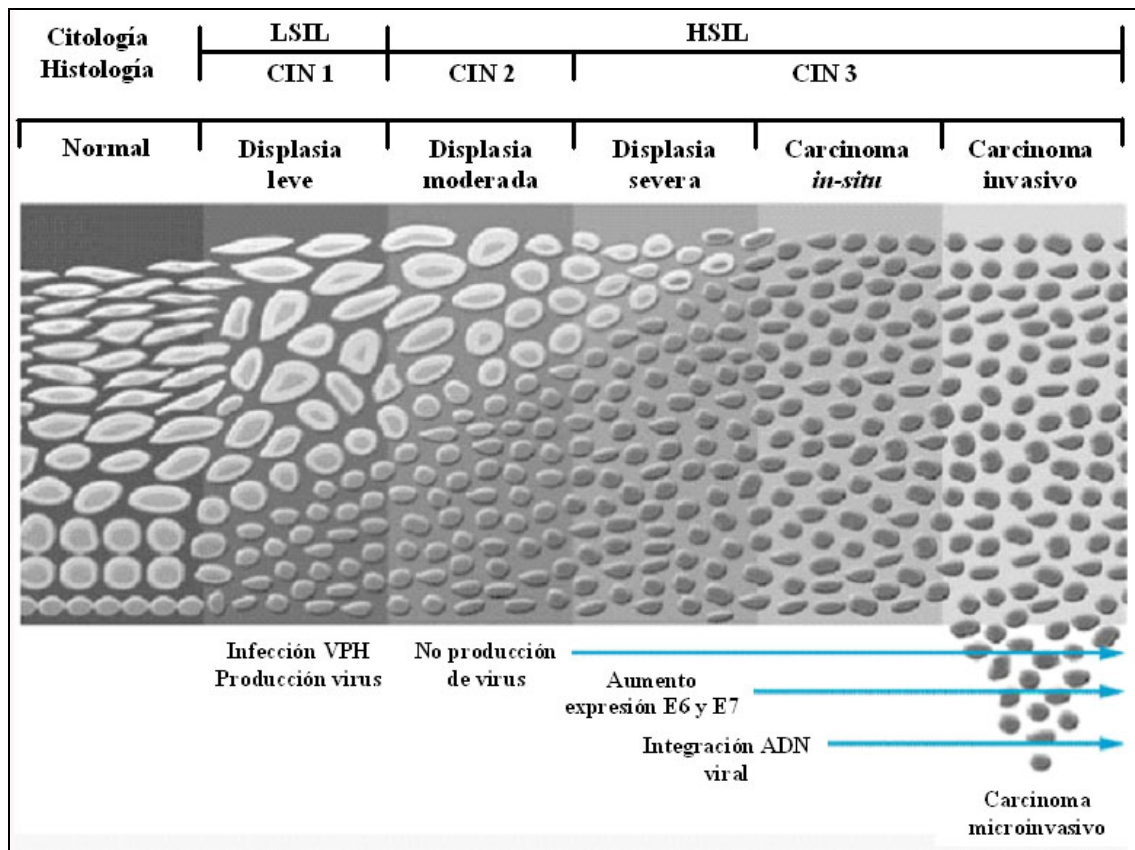


Figura 1.8. Progresión de lesión condilomatosa benigna a carcinoma invasivo. Modificada de Lowy & Schiller, 2006.

El cérvix contiene dos tipos de epitelio: (I) escamoso, localizado en la parte más externa y constituido por varias capas de células estratificadas; (II) columnar: localizado en la parte interna del cérvix, monoestratificado y constituido por células altas, delgadas y uniformes en tamaño y forma. La zona donde ambos epitelios confluyen recibe el nombre de unión escamo-columnar. Con la edad, el epitelio columnar va siendo desplazado hacia la zona interna del cérvix y va siendo sustituido por epitelio escamoso. La región donde ocurre dicha sustitución recibe el nombre de región de transformación.

La mayoría de los cánceres tienen lugar en la zona de transformación, siendo el 85% de ellos carcinomas de células escamosas. El resto suelen ser adenocarcinomas, y finalmente un pequeño porcentaje se trata de tumores neuroendocrinos. La mayoría de las lesiones no van a progresar, sino que se resolverán espontáneamente, siendo menor la probabilidad de regresión a medida que aumenta la gravedad de la lesión. Generalmente, las displasias más severas proceden de lesiones previas que han evolucionado durante años, si bien, una proporción de ellas puede desarrollarse rápidamente sin pasar por un grado menor (Koutsky *et al.*, 1992). La edad media a la cual las mujeres desarrollan cáncer de cérvix es de 50 años, mientras que la edad media

de las mujeres diagnosticadas de HSIL es de 28. Estos datos sugieren la existencia de un estado precanceroso largo (Baseman & Koutsky, 2005).

El VPH tipo 16 es el tipo de alto riesgo más oncogénico, seguido del tipo 18. Entre ambos, son los responsables de alrededor del 70% de los cánceres de cérvix. En el caso de infecciones asintomáticas prevalentes, tras el seguimiento de las mismas durante 10 años, se ha observado que, cuando están implicados los tipos 16 y 18 es más frecuente que se evolucione hacia HSIL o cáncer invasivo que si se trata de otros tipos (Khan *et al.*, 2005).

Cabe destacar que mientras que la mayoría de los estudios se han centrado en el cáncer más común (el de las células escamosas), los adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos y carcinomas de tipo endocrino, también contienen ADN de VPH. La mayoría de esos tumores están asociados con el VPH tipo 18.

1.2.1.2 Verrugas anogenitales (Condilomas)

La acumulación de verrugas en la zona anogenital recibe el nombre de condiloma acuminado (*condyloma acuminata*). Los condilomas son muy prevalentes dentro de los jóvenes y adultos sexualmente activos. El aumento de la promiscuidad a mediados de los años 60 se tradujo en un aumento de al menos cuatro veces la incidencia de los condilomas.

Las verrugas genitales normalmente son lesiones exofíticas benignas que pueden presentarse en cualquier zona de los genitales externos e internos, pudiendo aparecer en múltiples sitios de manera simultánea. También pueden aparecer otros tipos de lesiones como son verrugas planas, pápulas pigmentadas y lesiones que sólo se observan cuando se tiñen con ácido acético.

En el 10-20% de los casos las verrugas revierten espontáneamente, aunque algunas lesiones pueden persistir durante años, e incluso recurrir tras el tratamiento de las mismas (von Krogh, 2001).

Aproximadamente el 90% de las verrugas son debidas a infección con VPH6 o VPH11, siendo el primero el tipo predominante, si bien se pueden encontrar otros tipos en estas lesiones, incluso de alto riesgo, como el VPH16 (Howley & Lowy, 2007).

1.2.1.3 Otras infecciones del tracto genital

Los VPH genitales, al igual que infectan el cérvix, pueden infectar otras áreas que contengan epitelio escamoso estratificado, encontrándose con frecuencia ADN de

VPH (normalmente tipo 16) en cánceres de vulva, vagina y pene. Los tipos de bajo riesgo también se encuentran en éstas áreas, siendo una condición especial el condiloma acuminado gigante, que es un carcinoma invasivo de células escamosas de bajo grado (Howlley & Lowy 2007).

El cáncer anal presenta numerosas similitudes con el cáncer de cérvix. Aparentemente se trata de una infección transmitida sexualmente, si bien parece que algunas infecciones son debidas a la diseminación desde otras áreas genitales. Como en el caso del cáncer de cérvix, en la mayoría de los casos de cáncer anal se detecta ADN de VPHs de alto riesgo, siendo el tipo 16 el más frecuente. La mayor parte de este tipo de cánceres tienen lugar en la zona de transición entre el epitelio columnar y el escamoso (Howley & Lowy, 2007).

1.2.2 Otras infecciones

Las infecciones benignas de la cavidad oral son frecuentes, pudiendo ser asintomáticas o asociarse con lesiones individuales o múltiples, en la mitad de las cuales se detecta ADN de VPHs de la mucosa genital, fundamentalmente los tipos VPH6 y 11, aunque también el VPH16 (Howley & Lowy, 2007).

Algunos tumores de cabeza y cuello se relacionan con infección por VPHs, localizándose la mayoría en la zona orofaríngea, incluyendo las amígdalas, la base de la lengua y el velo del paladar (Gillison, 2004).

Una manifestación especial es la papilomatosis respiratoria recurrente (papilomatosis laríngea), que parece que puede transmitirse verticalmente cuando la madre presenta historia de verrugas genitales. Se trata de una manifestación poco frecuente producida por tipos de VPH asociados con verrugas genitales externas, especialmente por los tipos 6 y 11, en la que los papilomas pueden comprometer seriamente la funcionalidad de las vías aéreas, especialmente en niños.

1.3 EPIDEMIOLOGÍA

La infección genital por el VPH es la infección de transmisión sexual más común entre las mujeres. Se estima que el volumen de mujeres infectadas por VPH es de alrededor de 300 millones y que más de 490.000 desarrollarán un cáncer de cuello uterino (Parkin, 2006), que es el segundo tipo más común en mujeres de entre 15 y 44 años de edad, después del cáncer de mama y la tercera causa de muerte por cáncer entre la población femenina, después del cáncer de mama y el de pulmón. Cada año mueren

270.000 mujeres a causa de esta enfermedad (Ferlay *et al.*, 2002). El 83% de los casos de cáncer de cuello de útero tiene lugar en países en desarrollo, donde representa el 15% de los cánceres femeninos. En los países desarrollados sólo representa el 3,6% de los nuevos casos de cáncer. Las tasas de incidencia más altas se observan en África subsahariana, Melanesia, América Latina y el Caribe, Asia central-meridional y sudeste asiático (Castellsagué *et al.*, 2007) (Figura 1.9).

El estudio de las infecciones del cérvix por VPH, así como la epidemiología del cáncer de cérvix en relación con el VPH se lleva a cabo empleando como marcadores de exposición la presencia de ADN viral en cepillados o en biopsias tisulares (Muñoz, 2000).

La detección de los tipos de VPH mediante técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presenta una gran variabilidad en la población general, según la edad y la situación geográfica. En mujeres asintomáticas de la población general, la prevalencia de infección por VPH oscila entre un 2 y un 44% (Trottier & Franco, 2006). Esta gran variación puede ser explicada por las diferencias de edad entre las muestras estudiadas y por variaciones en la sensibilidad de los ensayos usados para la detección del ADN viral. Los datos actuales ponen de manifiesto que la prevalencia media de infección por VPH a nivel mundial es de un 10,41-10,50% (Clifford *et al.*, 2005; de Sanjosé, 2006). Los resultados de diversos estudios de prevalencia de la infección por VPH en España, arrojan datos que varían desde un 3% en un estudio sobre población de Barcelona (de Sanjosé *et al.*, 2003) hasta un 17% en mujeres con citología normal en el País Vasco (Múgica-Van Herckenrode *et al.*, 1992).

En relación con la edad, la prevalencia es máxima en mujeres jóvenes (alrededor de 25 años) y disminuye en grupos de mediana edad. En la mayoría de los estudios realizados en todo el mundo, se observa un aumento de la prevalencia en edades peri o post-menopáusicas (45-50 años), a excepción de Asia (Castellsagué *et al.*, 2007). Las razones para este segundo pico y para su variación geográfica, no están claras, pero podrían estar influenciados por uno o varios mecanismos: adquisición de nuevas infecciones a través de nuevos contactos a una edad más madura, por un efecto de cohorte, o por la reactivación de infecciones latentes (Trottier & Franco 2006).

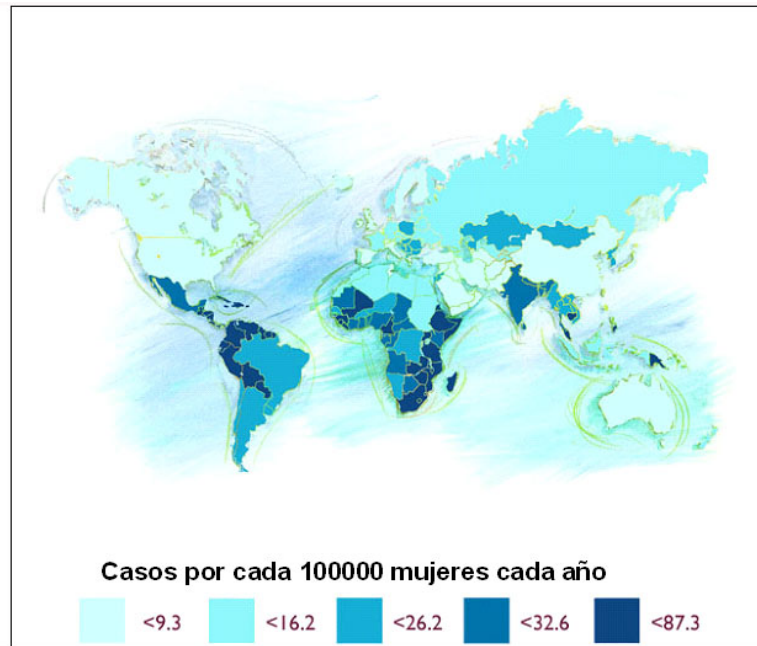


Figura 1.9. Tasas de incidencia estandarizadas (según la población mundial) por edad del cáncer de cuello de útero en 2002 (Ferlay *et al.*, 2002).

Dado que la transmisión de la infección por VPH tiene lugar fundamentalmente mediante contacto sexual, la conducta sexual es un factor determinante en el riesgo de contraerla. El número de parejas sexuales así como la edad temprana de inicio de la actividad sexual aumentan dicho riesgo.

La infección persistente por VPHs oncogénicos es el primer requisito para la carcinogénesis cervical, aunque otros cofactores (ambientales o congénitos) pueden modular la persistencia y la progresión neoplásica (Bosch *et al.*, 2006). Entre los cofactores estudiados cabe destacar: (I) uso de anticonceptivos orales: parece que el riesgo de cáncer de cuello uterino aumenta cuando se toman durante más de 5 años, y que el riesgo disminuye después de interrumpir su uso; (II) alta paridad: el número de embarazos a término se asocia con un aumento en cuatro veces del riesgo de carcinoma de cuello de útero invasivo; (III) hábito tabáquico: las mujeres fumadoras presentan un aumento significativo del riesgo de cáncer de cuello de útero en comparación con las no fumadoras; (IV) coinfecciones con otros agentes de transmisión sexual como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el Herpesvirus humano-2 o *Chlamydia trachomatis* (Baseman & Koutsky, 2005).

Finalmente, debe considerarse que existen otras vías de transmisión diferentes a la sexual. La evidencia de que existen vías no sexuales ha sido establecida por múltiples autores que han concluido que: (1) la infección con VPHs genitales se encuentra en

ocasiones en mujeres vírgenes, bebés y niños; (2) existen algunas evidencias de transmisión horizontal de tipos de bajo riesgo (3) existe transmisión vertical y perinatal de VPHs entre madres e hijos en el momento del parto (4) se pueden encontrar tipos genitales de alto riesgo en zonas como la boca, la orofaringe y la conjuntiva (Bosch & de Sanjosé, 2007).

Las investigaciones longitudinales realizadas hasta hoy, muestran que la mayoría de las infecciones por el VPH son transitorias, pasando a no ser detectables en 1-2 años. Como ya se ha indicado, las infecciones por tipos de alto riesgo parecen persistir durante más tiempo que las producidas por tipos de bajo riesgo, siendo la infección con el tipo 16 la más persistente.

En cuanto a los tipos de VPH, la proporción relativa de los 5 tipos más frecuentes en la población infectada con VPH con citología normal se muestra en la Figura 1.10. El tipo 16 se identifica en el 25,5% de las mujeres diagnosticadas, seguido del tipo 18 (7,5%) y el 31 (6,1%) (Bosch & de Sanjosé, 2007).

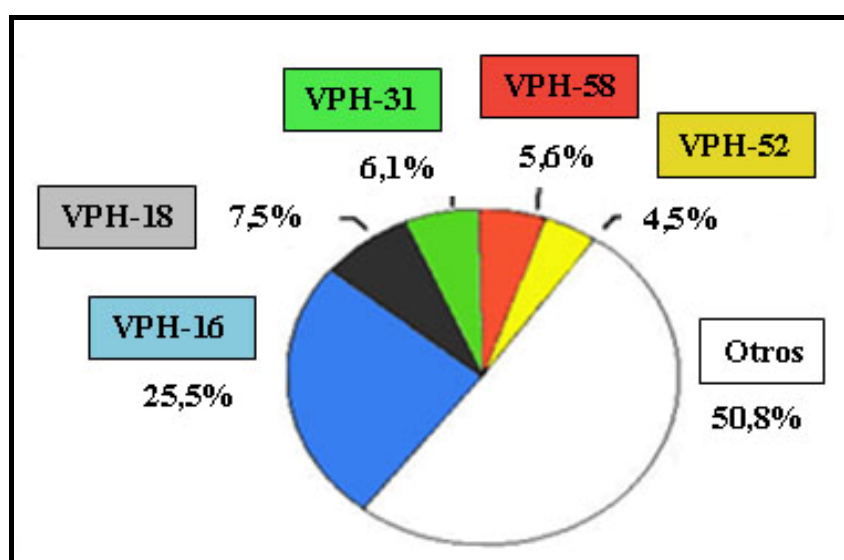


Figura 1.10. Proporción relativa de los 5 tipos de VPH más comunes en pacientes positivos a ADN con citología normal (Modificada de Bosch & de Sanjosé, 2007)

1.4 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR VPH

1.4.1. Diagnóstico molecular

Debido a las limitaciones de las técnicas basadas en la serología, el diagnóstico actual de la infección por VPH recae en la detección de ácido nucleico viral. Los métodos de diagnóstico molecular del VPH así como la caracterización de tipos y

variantes han sido muy útiles debido a la limitación que supone la ausencia de sistemas de cultivos *in vitro*. La mayor parte de los métodos de identificación directa de infección por VPH están basados en la detección del ADN del virus, aunque también se han desarrollado sistemas basados en la detección del ARN (Ortiz *et al.*, 2006).

Existen diversos sistemas de detección de ADN de VPH, que pueden ser clasificados en dos grandes grupos: (i) Sistemas de amplificación de la señal, (ii) Sistemas de amplificación de secuencias diana.

1.4.1.1 Sistemas de amplificación de señal

El método más utilizado se basa en un ensayo de captura de híbridos (*Test Digene Hybrid CaptureTM HPV DNA*), que es un método no radiactivo de amplificación de la señal, basado en la hibridación en solución del ADN de interés a sondas de ARN. Permite la detección de 13 tipos de VPHs de alto riesgo (VPHs16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y 5 tipos de bajo riesgo (VPHs 6, 11, 42, 43 y 44). Presenta una sensibilidad de 1 picogramo de ADN de VPH16 clonado por mililitro de muestra (Kónya *et al.*, 2000, Peyton *et al.*, 1998, Poljak *et al.*, 1999, 2002).

Este método posee múltiples ventajas como la reproducibilidad y la automatización, pero también algunas limitaciones, entre las que cabe destacar: (i) no permite la identificación de los tipos; (ii) se han descrito hibridaciones cruzadas entre las dos mezclas de sondas y con tipos no incluidos en las mismas; (iii) sensibilidad inferior a la de la PCR.

1.4.1.2 Sistemas de amplificación de secuencias diana

Entre los sistemas de amplificación de secuencias diana, la técnica más empleada es la de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se han ensayado diferentes tipos de PCRs para detectar ADN de VPH:

- 1) PCRs específicas de tipo: utilizan cebadores específicos diseñados para amplificar de forma exclusiva un tipo de VPH, de manera que para detectar la presencia de ADN de VPH en una única muestra, es necesario llevar a cabo múltiples reacciones de forma separada.
- 2) PCR de amplio espectro: se emplean oligonucleótidos consenso que pueden ser utilizados para amplificar un amplio espectro de VPHs. La mayoría están centrados en la región L1, dado que es una de las regiones más conservadas dentro del genoma de los

VPHs (Coutlée *et al.*, 2002, Gravitt *et al.*, 2000, Kay *et al.*, 2002, Peyton *et al.*, 1998, Qu *et al.*, 1997). Existen tres diseños diferentes de cebadores consenso: (1) aquellos que incluyen una pareja única de cebadores, diseñados sobre una región conservada; (2) los que incorporan varias parejas de cebadores, con degeneraciones para compensar las variaciones intertípicas (ejemplo MY09/MY11); (3) los que combinan una serie de parejas de oligonucleótidos diferentes, que se unen en las mismas posiciones del genoma.

3) PCR en tiempo real: esta técnica se ha introducido en los últimos años con objeto de determinar cuantitativamente la carga viral.

Para el tipado de los productos de PCR es preciso llevar a cabo el análisis posterior de los productos de amplificación, pudiéndose emplear diferentes técnicas: (1) análisis de los patrones de restricción de los productos de PCR que resulta de especial interés en el caso de infecciones múltiples (Bernard *et al.*, 1994); (2) secuenciación directa de los productos de hibridación; (3) hibridación, para caracterización directa de los productos amplificados en presencia de biotina.

La hibridación reversa es el método más utilizado para detección y tipado de infecciones múltiples por VPH. Los productos de PCR marcados con biotina, se hibridan con múltiples sondas (específicas de tipo) inmovilizadas en una tira de nitrocelulosa. Los híbridos son detectados mediante una reacción colorimétrica. Existen dos sistemas representativos de esta tecnología: INNO-LIPA (Innogenetics) y *Linear Array Genotyping HPV test* (Roche-Diagnostics).

Existe además una técnica basada en la detección del ARN viral mediante transcripción inversa (RT-PCR), que puede resultar de gran utilidad clínica ya que permite evaluar la expresión de los oncogenes del VPH. Actualmente se ha desarrollado un sistema que detecta la expresión de oncogenes E6/E7 de los tipos de alto riesgo más frecuentes, utilizando la tecnología de amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) combinada con detección a tiempo real.

1.4.2 Examen citológico e histopatológico

1.4.2.1 Test de papanicolau

Este método toma su nombre del Dr. George Papanicolau que desarrolló esta técnica en el año 1928 y cuyo uso se generalizó a partir de 1950 (Papanicolau, 1942).

Consiste en la realización de un frotis de células tomadas de la región externa del cérvix, sometiéndose a tinción con sucesivos colorantes (hematoxilina, ácido hidrociorhídrico, Naranja G y EA50), para poder observar así la arquitectura citológica (Frappart *et al.*, 2004). Las células precancerosas o cancerosas presentan características anómalas que pueden ser observadas al microscopio.

El 80% de los cánceres de cérvix se pueden prevenir por un programa de cribado basado en el test de papanicolau (Prendiville & Davies, 2004; Schiller & Davies, 2004) a pesar de que la frecuencia de falsos positivos está entre el 5 y el 44% y la de falsos negativos en torno a un 17,5% (vander Graaf *et al.*, 1987). Esto último supone un riesgo potencial de desarrollar una displasia cervical no detectada, que podría evolucionar a cáncer de cérvix.

1.4.2.2 Colposcopia

Consiste en un examen visual de la vagina y el cérvix, empleando un colposcopio, que normalmente se lleva a cabo cuando los resultados de la citología indican la presencia de alguna anormalidad en el cérvix. En esta técnica se pueden aplicar diversas soluciones *in-situ*, para facilitar la identificación de anomalías del epitelio vaginal y del cérvix.

1.4.2.3 Biopsia

Se emplea para confirmar el diagnóstico mediante el análisis anatomopatológico de las muestras tomadas del endocervix y la zona de transformación, sobre todo en lesiones de tipo HSIL.

1.4.3 Utilidad clínica del diagnóstico de la infección por VPH

En noviembre de 2006, la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO), la Sociedad Española de Citología (SEC), la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC) y la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) publicaron un documento de consenso para el cribado primario del cáncer de cuello de útero, en el que se recomienda la realización de la primera citología a los 3 años del inicio de la actividad sexual, aconsejándose una citología anual en mujeres menores de 30 años. Tras tres citologías negativas puede considerarse su repetición cada tres años, salvo conducta sexual de riesgo, cambios de pareja o inmunosupresión. El

cribado terminaría a los 65 años de edad (Puig-Tintoré *et al.*, 2006). En este documento se destaca la importancia de la combinación del test de detección de VPH y la citología.

Dado que se sabe que los tipos de VPH 16 y 18 tienen un riesgo mayor de desarrollar HSIL o adenocarcinoma que otros tipos de alto riesgo, y que se ha demostrado que estos tipos son los dos más prevalentes en los cánceres escamosos y adenocarcinomas, se ha propuesto que las mujeres positivas para ellos se sometan a una colposcopia inmediata o a un seguimiento más intensivo (6 y 12 meses). Por el contrario, las mujeres VPH positivas para tipos de alto riesgo distintos a los tipos 16 y 18 pueden tener un seguimiento menos intensivo (en intervalos de 1-2 años).

1.5 PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS DE VPH

Diversas proteínas virales han sido producidas en distintos sistemas de expresión tanto procariotas (basados fundamentalmente en *Escherichia coli*) como eucariotas (sobre todo en levaduras y células de insecto).

1.5.1 Expresión de la proteína L1

Dadas las características descritas para la proteína L1 y su capacidad de ensamblaje cuando se expresa en sistemas heterólogos, han sido múltiples los esfuerzos desarrollados para su producción, especialmente en forma nativa para la posterior purificación de VLPs, en tanto que han sido menos las aproximaciones basadas en generación de proteínas recombinantes de L1. La proteína mayoritaria de la cápsida de diversos tipos de VPH, especialmente de alto riesgo, ha sido producida tanto en bacterias, como en levaduras, células de insecto e incluso en plantas. En la Tabla 1.3 se reflejan algunos de los trabajos más relevantes en cada uno de los sistemas, cuyos resultados serán discutidos más adelante.

En el caso de bacterias, la proteína L1 de distintos tipos de VPH ha sido expresada fundamentalmente en *E. coli*, empleando diversos vectores, en la mayoría de los casos como proteína de fusión con GST. Existen dos trabajos en los que la proteína L1 de VPH 16 ha sido producida en otro tipo de bacterias, como son *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis*, siendo expresada en el primer caso en forma nativa, y como proteína de fusión a MBP (proteína de unión a maltosa) en el segundo. Se ha visto que la proteína L1 expresada en bacterias también presenta capacidad de ensamblarse en pentámeros e incluso VLPs.

Además ha sido expresada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con la detección de VLPs en la mayoría de los trabajos publicados. Generalmente la construcción incluye la secuencia que codifica la proteína L1 en forma nativa, o la secuencia para L1 y para L2. La proteína L1 producida en esta levadura, ha sido empleada en una de las vacunas desarrolladas y comercializadas en la actualidad (Gardasil, Merck), y existe un único trabajo, de muy escasa repercusión, en que la proteína L1 de VPH6 ha sido expresada en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

Los trabajos iniciales de expresión de la proteína L1 se llevaron a cabo en cultivos celulares, empleando células de mamífero y vectores basados en el *virus vaccinia*. En el trabajo pionero, de Zhou y colaboradores (Zhou *et al.*, 1991), se modificó la secuencia de L1 para eliminar las señales de localización nuclear, y además es el primero en el que se publica la formación de VLPs.

Finalmente, la producción de VLPs de L1 de distintos tipos de VPH en células de insecto empleando baculovirus recombinantes se ha realizado en múltiples trabajos, siendo pioneros los de Kirnbauer y colaboradores en el año 92.

Es de destacar que la mayoría de las publicaciones son referidas a VPH16 como representante de los tipos de alto riesgo y/o a VPH11 como representante de los tipos de bajo riesgo. Pocos son los relacionados con la expresión del segundo tipo de alto riesgo más frecuente, el tipo 18.

Bacterias	Proteína recombinante	Generación VLPs	CITAS	Tipo VPH
<i>Escherichia coli</i>	GST-L1-colaSV40	No	Sehr <i>et al.</i> , 2002.	6, 16 y 18
	L1-(His) ₆	Sí	Zhang <i>et al.</i> , 1998	16
		No	Di Bonito <i>et al.</i> , 2006	16
	L1	Sí	Li <i>et al.</i> , 1997	11
	GST-L1	Sí	Chen <i>et al.</i> , 2001	16 y 11
			Casini <i>et al.</i> , 2004 Hanslip <i>et al.</i> , 2006	11 16
<i>Lactobacillus casei</i>	L1	Sí	Araujo <i>et al.</i> , 2006.	16
<i>Lactococcus lactis</i>	MBP-L1	No	Cho <i>et al.</i> , 2007.	16
Levaduras				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L1	No	Carter <i>et al.</i> , 1991 Zhao <i>et al.</i> , 2005	1, 6 y 16 16
	L1 y L1+L2	Sí	Hofmann <i>et al.</i> , 1995	6a
	L1		Neeper <i>et al.</i> , 1996	11
			Cook <i>et al.</i> , 1999	11
			Joyce <i>et al.</i> , 1999	11
			Park <i>et al.</i> , 2002	16
			Mach <i>et al.</i> , 2006	6, 16, 11 y 18
<i>Pichia pastoris</i>	L1	N.A.	Li <i>et al.</i> , 2003	6
Células animales				
<i>Baculovirus</i> (células de insecto)	L1	Sí	Kirnbauer <i>et al.</i> , 1992	1 y 16
			Rose <i>et al.</i> , 1993	11
			Le Cann <i>et al.</i> , 1994	16
			Touzé <i>et al.</i> , 1998, 2000	16
			Karem <i>et al.</i> , 2002	16
	L1+L2	Sí	Studentsov <i>et al.</i> , 2002	16
	L1-(His) ₆		Zheng <i>et al.</i> , 2004	16
<i>Virus vaccinia</i> (células epiteliales)	L1	Sí	Zhou <i>et al.</i> , 1991	16
			Mossadegh <i>et al.</i> , 2004	11
Plantas				
<i>Nicotiana benthamiana</i>	L1	Sí	Varsani <i>et al.</i> , 2006	16

Tabla 1.3. Sistemas heterólogos empleados para la producción de la proteína L1 de distintos tipos de VPH. N.A.: no analizado.

1.5.2 Expresión de otras proteínas de VPH

Si bien la mayor parte de los trabajos se han centrado en la expresión de la proteína L1 de VPH en sistemas heterólogos, también se han expresado otras proteínas del virus, tanto en sistemas procariotas como en sistemas eucariotas.

Las proteínas E6 y E7 son de especial interés dado que se trata de oncoproteínas, cuya expresión se ve incrementada en el epitelio infectado cuando la evolución es hacia lesiones más graves (HSIL) especialmente en los casos de cáncer. Además, en este tipo de lesiones, normalmente no se expresan los genes correspondientes a las proteínas estructurales L1 y L2 (Doorbar, 2007; Matlashewski *et al.*, 1986), lo cual hace aún más interesantes a estas oncoproteínas como marcadores serológicos de infección. Finalmente se encuentra mayor respuesta de anticuerpos frente a las proteínas E6 y E7 en pacientes con cáncer de cérvix, si bien éstos también aparecen en pacientes sin dicha patología, lo que pone en dudas su capacidad para predecir el desarrollo de cáncer cervical (Di Bonito *et al.*, 2006).

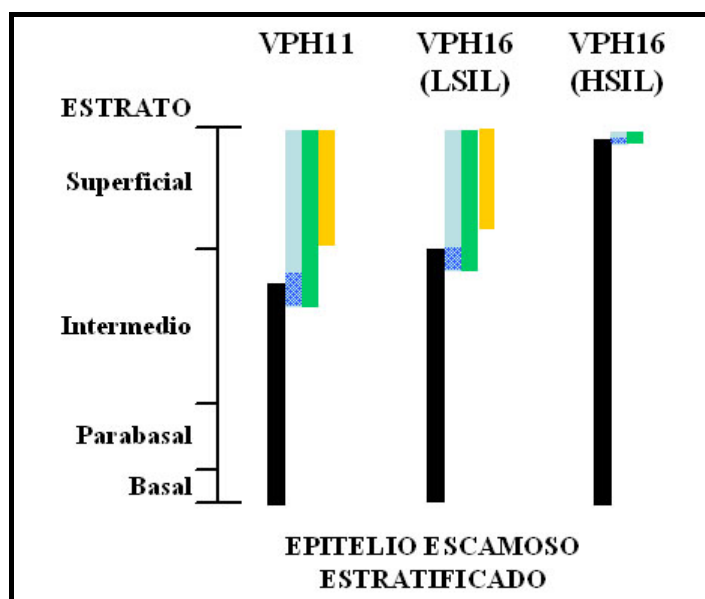


Figura 1.11: Esquema de la expresión diferencial de proteínas de VPH en el epitelio escamoso estratificado, en función del tipo de VPH y la progresión de la infección. Las barras negras representan la expresión de E7, las barras azules la presencia de ADN viral amplificado, la parte sombreada de éstas representa dónde tiene lugar la amplificación vegetativa del genoma viral, las barras verdes representan la expresión de E4 y las naranjas la expresión de L1. Modificada de Peh *et al.*, 2002.

Estas proteínas han sido expresadas en levaduras (Meschede *et al.*, 1997) y también en *E. coli* como proteínas de fusión con GST en su extremo C-terminal (Sehr *et al.*, 2001; Waterboer *et al.*, 2005), como proteínas de fusión con colas de polihistidina

en su extremo N-terminal (Di Bonito *et al.*, 2006), o como proteínas de fusión con β -galactosidasa (Matlashewski *et al.*, 1986).

La proteína E4 se expresa en las infecciones productivas por VPH, y su expresión coincide con la replicación vegetativa del ADN que tiene lugar en células del epitelio mucoso que migran hacia las capas superiores (apartado 1.1.6), siendo la proteína viral más abundante en el interior celular. Así podría tener importancia como antígeno, ya que podrían generarse anticuerpos frente a ésta. La proteína E4 ha sido expresada en bacterias (*E. coli*) como proteína de fusión con colas de polihistidina (Di Bonito *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Finalmente, se sabe que la proteína L2 contiene epítomos en la región N-terminal que inducen anticuerpos neutralizantes de amplio espectro. Así, esta proteína podría inducir respuestas de anticuerpos capaces de reconocer varios tipos de VPH, de forma que se plantea que la vacunación con un antígeno con reactividad cruzada puede suponer una alternativa a las vacunas multivalentes. De ahí el interés en la producción de antígenos relacionados con L2. En el trabajo desarrollado por Gambhira y colaboradores (Gambhira *et al.*, 2007), se indica que la inmunización con la proteína truncada producida en bacterias, que contiene los residuos de la región N-terminal 11 a 200, es capaz de generar una respuesta de anticuerpos de amplio espectro que no se consigue con la inmunización llevada a cabo con la proteína recombinante completa. La proteína L2 completa ha sido incluida también en los ensayos de serología múltiple llevados a cabo por Di Bonito y colaboradores, mostrándose fundamentalmente como específica de tipo (Di Bonito *et al.*, 2006).

1.6 SEROLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VPH

Como ya se ha comentado en el apartado dedicado a la inmunidad, se ha demostrado que la infección con VPHs genitales va seguida de una respuesta inmune tanto de tipo celular como de tipo humoral, esta última dirigida fundamentalmente a las proteínas de la cápsida viral. Los anticuerpos anti-VPH, podrían ser indicadores de infecciones recientes y pasadas. La seroconversión ocurre entre los 6 y los 18 meses después de la detección del ADN de VPH, pero en pacientes con detección transitoria de ADN tiene lugar con poca frecuencia. Los anticuerpos frente a proteínas de la cápsida están por tanto asociados con la detección persistente de ADN y son detectables durante muchos años (Combata *et al.*, 2002, Touzé *et al.*, 2001).

Los métodos serológicos de VPH no se utilizan en el diagnóstico habitual. Hasta el momento no hay ningún método comercial validado y todos los descritos son de diseño *in-house* y se realizan en un número limitado de laboratorios (Di Bonito *et al.*, 2006, Karem *et al.*, 2002, Sehr *et al.*, 2002, Touzé *et al.*, 2001).

La mayor innovación en la serología de VPH, fue el uso de la tecnología del ADN recombinante para producir la proteína mayoritaria de la cápsida (L1), que se autoensambla en VLPs (Studentsov *et al.*, 2003), cuando se expresa en diversos sistemas (Tabla 1.3). También existen algunas aproximaciones en las que se han utilizado como antígenos las proteínas tempranas E4, E6, E7 e incluso la proteína L2 (Meschede *et al.*, 1998, Sehr *et al.*, 2001, Di Bonito *et al.*, 2006), y otras en las que se utilizan péptidos sintéticos (Rocha-Zavaleta, 2004).

Las metodologías empleadas se han basado en ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Radioinmunoensayos (RIA) y ensayos de neutralización. Sin embargo, estas aproximaciones hasta ahora han mostrado baja especificidad e insuficiente sensibilidad (Pagliusi *et al.*, 2007). Los ensayos realizados con VLPs producidas en células de insecto o levaduras, han sido los que mejores resultados han lanzado, de forma que se consideran los patrones de referencia (Sehr *et al.*, 2002)

Hasta la fecha se ha realizado un único estudio internacional para evaluar la posible estandarización de los métodos serológicos, coordinado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Ferguson *et al.*, 2006), que demostró que los títulos de anticuerpos frente al VPH16 detectados en una misma muestra podían variar hasta 25 veces en función del ensayo empleado.

De todo esto se deduce que no existe un patrón o método de referencia para valorar la respuesta serológica frente al VPH. Los trabajos más recientes apuntan hacia el desarrollo de sistemas que permiten la valoración de la respuesta inmune frente a diferentes antígenos de forma simultánea, ya que los resultados muestran un incremento en la capacidad para detectar sueros positivos, y en definitiva un incremento en la sensibilidad (Waterboer *et al.*, 2005).

1.7 DESARROLLO DE VACUNAS PROFILÁCTICAS

Aunque la mayoría de las vacunas antivirales se basan en el uso de viriones, la producción de éstos en el caso de VPH en cantidades suficientes es muy difícil. Además, dado que los viriones de VPH contienen oncogenes, el uso de viriones

atenuados ha sido concebido como una estrategia demasiado arriesgada para el desarrollo de la vacuna frente al VPH (Castellsagué *et al.*, 2006).

Así, el desarrollo de vacunas profilácticas frente al VPH comenzó en el año 1993, siendo el factor decisivo el descubrimiento de la capacidad de autoensamblaje de la proteína L1 que permitía la obtención de VLPs (Campins *et al.*, 2007). Las VLPs son morfológicamente idénticas a los viriones VPH nativos, con la diferencia de que no contienen material genético en su interior, de forma que al presentar los epítomos conformacionales propios del virus son altamente inmunogénicas, pero no pueden causar infección en el huésped.

En la actualidad, existen dos vacunas. Una bivalente frente a los tipos de alto riesgo VPH16 y 18, que se presentan como los responsables de aproximadamente el 70% de los cánceres de cérvix, y otra tetravalente que incluye además los tipos de bajo riesgo 6 y 11, que son los responsables del 90% de las verrugas genitales.

La vacuna bivalente, desarrollada por GlaxoSmithKline (comercializada con el nombre de Cervarix), está compuesta por 20 µg de VLPs de los VPHs tipo 16 y 18, producidas mediante el empleo de baculovirus recombinantes (en células de insecto Sf9 y Hi5 respectivamente). En los estudios realizados sobre esta vacuna se observa que los títulos de anticuerpos en las mujeres vacunadas eran 80 a 100 veces superiores a los detectados en la infección natural. Tras la tercera dosis de la vacuna el 99,7% de las mujeres seroconvirtió frente al tipo 18 en tanto que el 100% lo hicieron frente al tipo 16 (Harper *et al.*, 2004). En un estudio de seguimiento publicado en 2006 se observa que la eficacia de la vacuna para la prevención de la infección incidente, persistente y de las lesiones intraepiteliales cervicales asociadas a los tipos vacunales, permanece inalterable a los 4 años y medio de la inmunización (96,9, 100 y 100% respectivamente). Además es de destacar la detección de inmunidad cruzada frente a la infección por los tipos 45 y 31, que son los tipos de alto riesgo más frecuentes tras el 16 y el 18 (Harper *et al.*, 2006).

La vacuna tetravalente, desarrollada por Merck (comercializada con el nombre de Gardasil), está constituida por 20 µg de VLPs de los tipos 6 y 18 y por 40 µg de VLPs de los tipos 11 y 16, producidas en la levadura *S. cerevisiae* (Villa *et al.*, 2005). La protección conferida frente a la infección por el tipo 6 fue del 100%, del 86% para el 16 y del 89% para el 18. Para el VPH tipo 11 la estimación de la eficacia no es estadísticamente fiable, ya que sólo se observaron tres eventos asociados a este tipo, en el seguimiento realizado durante 48 meses. En este caso a los 36 meses de seguimiento

se observó que los títulos de anticuerpos inducidos por la vacuna para los tipos 6 y 11, caían hasta prácticamente los observados en la infección natural. Sin embargo, los títulos de anticuerpos para los tipos 16 y 18 se mantenían sustancialmente más elevados que los inducidos por infección natural, especialmente los anticuerpos inducidos por las VLPs de VPH16.

Los resultados globales de los ensayos clínicos realizados, indican que la vacunación contra el VPH podría contribuir sustancialmente a reducir las tasas del cáncer de cuello uterino a nivel mundial. Los resultados también sugieren que estas vacunas son eficaces en la prevención de verrugas genitales (para la vacuna tetravalente) y de lesiones cervicales precancerosas (en ambos casos). Hay que tener en cuenta que, debido a que el período de incubación entre la infección persistente por VPH de alto riesgo y el desarrollo de un cáncer de cuello uterino invasor es muy largo, la prevención de este cáncer a partir de posibles programas de vacunación no será una realidad hasta dentro de 15 ó 20 años (Castellsagué *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La infección genital por el VPH es la infección de transmisión sexual más común entre las mujeres, registrándose cada año 500.000 casos nuevos de cáncer de cérvix, el cual es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres, después del de mama. Aproximadamente el 50% de los casos de cáncer de cuello uterino se asocian con el VPH de alto riesgo tipo 16, y un 20% adicional con el tipo 18. El 60% de las mujeres infectadas sufrirán seroconversión dentro de los 18 meses tras la detección de ADN de VPH. Los anticuerpos séricos de carácter neutralizante están dirigidos a epítomos conformacionales de la proteína L1, presentes en la superficie de la partícula viral intacta, aunque los niveles de anticuerpos en suero, tras la infección natural, son bajos. En la actualidad se han desarrollado dos vacunas frente al VPH, basadas en la utilización de VLPs conteniendo sólo la proteína L1. Ambas incluyen los tipos de alto riesgo 16 y 18, y una de ellas incorpora además los tipos de bajo riesgo más frecuentes (VPH6 y 11). Se estima que los títulos de anticuerpos adquiridos tras la vacunación son de 40 a 100 veces superiores a los derivados de la infección natural. Actualmente se desconoce la perdurabilidad de la protección conferida por estas vacunas por lo que se hace necesaria la generación de sistemas serológicos que permitan valorar la respuesta inmune humoral en infección natural y/o población vacunada. Surge así la necesidad de producir antígenos de VPH para el diseño de dichos sistemas serológicos, que han de ser sensibles y específicos. La producción de dichos antígenos debe ser lo más económica y sencilla posible. La mayor parte de los sistemas analizados hasta la fecha, se han basado en el uso de VLPs, por lo que uno de los antígenos más producidos ha sido la proteína mayoritaria de la cápsida viral (L1). Sin embargo, muy pocas han sido las aproximaciones realizadas con proteínas recombinantes basadas en dicho antígeno.

El objetivo del presente trabajo ha sido la producción la proteína L1 de VPH18, tanto como proteína recombinante en un sistema procariota (*Escherichia coli*), como en un sistema de expresión eucariota basado en una levadura metilotrófica (*Pichia pastoris*). Además se ha estudiado la cinética de expresión de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto empleando baculovirus recombinantes, con objeto de determinar los parámetros óptimos para la posterior obtención y purificación de VLPs, que en futuros estudios puedan ser aplicados para la producción más rápida y económica de dichas partículas.

Objetivos

Los objetivos concretos que se han desarrollado en el trabajo han sido:

1. Estudio del perfil de antigenicidad e hidrofobicidad de la proteína L1 de VPH18 para el diseño de las construcciones.
2. Expresión de la proteína L1 de VPH18 en *Escherichia coli* como proteína de fusión con GST en su extremo amino-terminal.
 - a) Obtención de las construcciones de interés para su clonación en el vector de expresión pGEX-4T.
 - b) Optimización de la producción y purificación de las proteínas recombinantes producidas como proteínas de fusión con GST.
 - c) Caracterización inmunológica de las proteínas recombinantes producidas.
3. Expresión de la proteína L1 de VPH18 en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* empleando vectores basados en el uso del promotor PAOX1.
 - a) Clonación del gen de interés en el vector pPICZ α para su producción como proteína de secreción y en el vector pPICZ para su expresión intracelular en forma nativa y posterior purificación de VLPs.
 - b) Análisis de la expresión de los clones de levadura transformados con las diferentes construcciones.
4. Expresión de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto para la producción de VLPs, mediante la utilización de baculovirus recombinantes.
 - a) Clonación del gen de interés en el vector de transferencia pBacPAK9 y generación de baculovirus recombinantes.
 - b) Optimización de la producción y purificación de VLPs de VPH18 producidas en células de insecto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Cepas bacterianas

Se utilizaron las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

1. **BL21 (Amersham)**: con genotipo $F^- ompT^- hsdS (rB^- mB^-)$, *gal*, *dcm*, lon^- . Cepa de *E. coli* que presenta deleciones en el gen *ompTK* y en el gen *lon*, que codifican proteasas que catalizan la degradación de proteínas dañadas o proteínas recombinantes.
2. **C41 (DE3)** y **C43 (DE3)**: cepas derivadas de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Obtenidas a partir de clones de BL21 que sufrieron mutaciones espontáneas y fueron sometidas a una selección fenotípica basada en la capacidad para sobrevivir después de la inducción de la expresión de una proteína recombinante tóxica. Amablemente cedidas por el Dr. Félix Gil.
3. **XL1-Blue** con genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]. Las células XL1-Blue son resistentes a tetraciclina, deficientes en endonucleasa A y proteína recA, lo que mejora la estabilidad de los insertos. La mutación *hsdR* previene la ruptura del ADN clonado por acción de la endonucleasa *EcoK*. Cedidas amablemente por el Dr. Luis Miguel González.
4. **TOP10F' (Invitrogen)**: genotipo F' {*proAB*, *lacIqZΔM15*, *Tn10* (TetR)} *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara-leu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL*(StrR), *endA1*, *nupG* λ^- . Recomendada para la clonación con el vector pCR2.1.-TOPO.

3.1.2 Cepas de levaduras

Se utilizaron las siguientes cepas de la levadura *Pichia pastoris* (Invitrogen) derivadas de la cepa NRRL-Y 11430 (*Northern Regional Research Laboratories*) (Higgins & Cregg, 1998):

1. **X-33**: cepa silvestre de la levadura, y por tanto de fenotipo silvestre para la utilización del metanol (Mut^+). Muy útil para la selección de clones recombinantes

resistentes a zeocina así como para crecimiento a gran escala. Puede crecer en medios mínimos y en medios complejos como el YPD.

2. **KM71H:** cepa en la que el gen *arg4* se encuentra interrumpiendo el gen *aox1* entre las dianas *Bam*HI y *Sal*I (*aox1::ARG4*). Por lo tanto es una cepa mutante con utilización lenta del metanol (Mut^s).

3. **GS115/pPICZ//lacZ Mut⁺ galactosidasa:** cepa que expresa la proteína β -galactosidasa fusionada al epítipo *c-myc* y a una cola de polihistidina en su extremo C-terminal. Expresa por tanto, una proteína de 119 KDa bajo la acción del promotor PAOX1 siendo inducible por metanol. La proteína es visible en SDS-PAGE y también mediante WB usando un anticuerpo anti-*myc*.

4. **GS115/His⁺Mut^s Albúmina:** cepa control para la expresión de proteínas secretadas y con fenotipo Mut^s. El gen para la albúmina sérica está clonado en el mismo marco de lectura de la señal de secreción nativa, y posteriormente se integró en el locus *AOX1*. Secreta la proteína Albúmina al medio (67 KDa) a niveles de 1 g/L.

3.1.3 Líneas celulares

1. **Línea HeLa:** línea celular epitelial humana, procedente de adenocarcinoma de cérvix, conteniendo virus del papiloma humano de tipo 18, obtenida de la ATCC (CRL-1958). El ADN de esta línea celular fue amablemente cedido por el Servicio de Diagnóstico y Referencia de Retrovirus y Papilomavirus del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (CNM, ISCIII).

2. **Líneas Sf21 (ILPB-Sf21) y Sf9 (IPLB-Sf9) de *Spodoptera frugiperda*** (Clontech): líneas celulares continuas desarrolladas a partir de los ovarios de la forma larvaria del insecto *S. frugiperda*. Presentan un tiempo de duplicación de 26-30 horas. La línea IPLB-Sf9 es un aislado clonal de la línea parental IPLB-Sf21-AE, tratándose de células más pequeñas y más uniformes en tamaño.

3.1.4 Vectores

a) Vectores de clonación

Vector **pCR 2.1-TOPO** (Invitrogen): vector de clonación de 3,9 Kb, especialmente diseñado para clonación de productos de PCR, que interrumpirán la secuencia que

codifica a la β -galactosidasa. Además contiene el promotor *lac*, orígenes de replicación en de *E. coli* pUC y de f1 y genes *nptII* y *bla* de resistencia a Kanamicina y Ampicilina respectivamente.

b) Vectores de expresión en bacterias (Amersham Biosciences)

Vectores **pGEX-4T-1, -2 y -3**: vectores de expresión de 4,9 Kb. Presentan un origen de replicación en *E. coli* de pBR322 y un gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina. El fragmento de ADN clonado se inserta en uno de los tres marcos de lectura en cada vector, bajo el control del promotor *tac*, el cual es reprimido por el gen *lacI^f*.

c) Vectores de expresión en *P. pastoris* (Invitrogen)

1. Vectores **pPICZA, B, C**: vectores de expresión de 3,3 Kb.

La estructura general de los vectores comprende un promotor inducible por metanol (P_{AOX}), un sitio de clonaje múltiple (con tres sitios posibles marcos de inserción), un origen de replicación en bacterias y un marcador común para selección en bacterias y en levaduras (gen *Sh ble*) que confiere resistencia a Zeocina, bajo dos promotores (uno de origen procariota y otro de origen eucariota). Poseen también la secuencia que codifica el epítipo *c-myc* corriente abajo del MCS, para facilitar la identificación de las proteínas recombinantes expresadas, mediante el uso de anticuerpos anti-*myc* y su posterior purificación por cromatografía de afinidad. Además, contiene regiones homólogas con el genoma de la levadura, que maximizan la estabilidad del casete de expresión introducido, al producirse fenómenos de recombinación que permiten su integración.

2. Vectores **pPICZ α A, B, C**: vectores de 3,6 Kb que presentan las mismas características que los vectores pPICZA, B y C, pero además contienen el gen que codifica la señal de secreción del factor α corriente arriba del MCS.

d) Vectores de expresión en células de insecto (Clontech)

1. Vector **pBacPAK9**: vector de 5,5 kilobases utilizado para la generación de baculovirus recombinantes en células de insecto. Contiene el promotor de la polihedrina modificado. La secuencia que codifica la polihedrina ha sido delecionada y sustituida por un MCS en el que se insertará el ADN de la proteína a expresar. Contiene también

una señal de poliadenilación, un origen de replicación para su mantenimiento en *E. coli* y un gen de resistencia a ampicilina.

2. Vector **BacPAK6**: vector viral especialmente diseñado para facilitar la construcción y selección de vectores de expresión recombinantes. El ADN viral ha sido digerido con la enzima *Bsu36I*, interrumpiéndose un gen esencial para la replicación viral, situado corriente abajo del gen de la polihedrina.

3. Vector **pBacPAK8-GUS**: vector de 7,4 Kb, que contiene el gen informador *Gus* que codifica la β -glucuronidasa, capaz de metabolizar el sustrato cromogénico X-Gluc, dando lugar a un producto de color azul. Diseñado como control positivo para reacciones de cotransfección de células de insecto.

e) Otros vectores

1. Vector **pcDNA 3.1 (+)** (Invitrogen): vector de 5,4 Kb diseñado para obtener altos niveles de expresión estable y transitoria en hospedadores mamíferos. Posee un MCS y un promotor intermedio-temprano de Citomegalovirus Humano que proporciona altos niveles de expresión en un gran número de células de mamífero, así como una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino. Además el vector posee un origen de replicación ColE1 (derivado de pUC) para la replicación en *E. coli* y un gen de resistencia a ampicilina, para la selección de clones recombinantes en la misma.

2. Plásmido número **45152 de la ATCC**, conteniendo ADN genómico de VPH tipo 18 clonado en el plásmido pBR322. Se utilizó como fuente de ADN de VPH18 para las construcciones realizadas en baculovirus y en *P. pastoris*.

3.1.5 Muestras clínicas

1. Extracciones de ADN de raspados cervicales de pacientes genéticamente caracterizados como infectados con VPH tipo 18, amablemente cedidas por el Servicio de Diagnóstico y Referencia de Retrovirus y Papilomavirus (CNM, ISCIII). Se emplearon las muestras 1V3VPH y 2V3VPH, procedentes de dos mujeres de origen brasileño y colombiano, respectivamente.

2. Sueros humanos: sueros de pacientes y plasmas de hemodonantes, amablemente cedidos por el Servicio de Diagnóstico y Referencia de Retrovirus y Papilomavirus (CNM, ISCIII), designados con la siguiente nomenclatura:

GP1 a GP17: sueros de pacientes genéticamente caracterizados como infectados con VPH tipo 18.

GN1 a GN5: sueros de pacientes genéticamente caracterizados como no infectados con VPHs de alto riesgo.

HD1 a HD10: plasmas de hemodonantes.

3. Gammaglobulina humana pasteurizada (Grifols): preparado consistente en una mezcla de plasmas de no menos de 1000 donantes que contiene anticuerpos IgG presentes en la población sana. La selección de donantes es realizada mediante despistaje de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y anticuerpos frente a VIH y VHC. Amablemente cedida por el Servicio de Diagnóstico y Referencia de Retrovirus y Papilomavirus (CNM, ISCIII).

3.1.6 Sueros animales

1. Suero completo de ratón: sueros de ratones hembras BALB/c, amablemente cedidos por el animalario del Centro Nacional de Microbiología (CNM, ISCIII).

3.1.7 Anticuerpos primarios

a) Anticuerpo HPV-4C4 (Novocastra): anticuerpo monoclonal, de tipo IgG1, desarrollado en ratón (mieloma NSI/1.Ag4.1), mediante inmunización con una proteína de fusión consistente en β galactosidasa-VPH6L1 (aminoácidos 40 a 233). Reconoce específicamente los tipos de VPH 6, 11 y 18.

b) Cóctel IH8 (Biocare Medical): mezcla de anticuerpos constituida por un anticuerpo policlonal desarrollado para el reconocimiento de VPB-1, y el anticuerpo monoclonal CAMVIR-1 que reconoce el VPH tipo 16. Este cóctel es capaz de reaccionar con los tipos de papilomavirus humanos 1, 6, 11, 16, 18 y 31 en ELISA y en inmunohistoquímica.

3.1.8 Anticuerpos conjugados

a) Anticuerpo Anti-myc^{AP} (Invitrogen): anticuerpo monoclonal producido en ratón, desarrollado para la detección de proteínas de fusión recombinantes, que contengan el epítipo c-myc, constituido por 10 aminoácidos.

b) Anticuerpo Anti-GST^{HRP} (GE Healthcare): anticuerpo anti-GST altamente específico, conjugado con peroxidasa de rábano, y optimizado para su uso en WB.

c) Anticuerpos secundarios conjugados con AP o HRP:

1. Anti-IgG humana^{HRP} y Anti-IgG humana^{AP} (Sigma)
2. Anti-IgG de ratón^{HRP} y Anti-IgG de ratón^{AP} (Sigma, BioRad)

3.1.9. Proteínas comerciales

GST (Sigma): enzima de 26 KDa, producida como proteína recombinante en *E. coli*, con más de un 85% de pureza.

3.1.10 Medios de cultivo

Los distintos medios empleados para el crecimiento de cultivo de bacterias, levaduras y células de insecto se detallan en las Tablas 3.1, 3.2 y 3.3 respectivamente.

<i>Medio</i>	<i>Componente</i>	<i>Concentración</i>	<i>Aplicación</i>
LB (Luria Bertani)	Extracto de levadura	5 g/L	Crecimiento y mantenimiento de cepas bacterianas. Expresión de proteínas recombinantes
	Tryptona	10 g/L	
	NaCl	5 g/L	
	Agar bacteriológico (sólo medio sólido)	15 g/L	
SOB pH7	Extracto de levadura	5 g/L	Crecimiento de cepas bacterias. Expresión de proteínas recombinantes
	Tryptona	20 g/L	
	NaCl	5 g/L	
	KCl 250 mM	1% (v/v)	
	MgCl ₂ (se añade en fresco)	0,5% (v/v)	
SOC	Extracto de levadura	5 g/L	Crecimiento de células competentes transformadas mediante choque térmico
	Tryptona	20 g/L	
	NaCl	10 mM	
	MgSO ₄	10 mM	
	MgCl ₂	10 mM	
	Glucosa	20 mM	

Tabla 3.1. Medios de cultivo empleados en el crecimiento bacteriano y en los experimentos de expresión.

<i>Medio</i>	<i>Componente</i>	<i>Concentración</i>	<i>Aplicación</i>
YPD	Extracto de levadura Bactopeptona Glucosa	10 g/L 20 g/L 20 g/L	Crecimiento y mantenimiento de levaduras
YPDS + Zeocina	YPD Sorbitol Zeocina (Invitrogen) Agar bacteriológico (sólo medio sólido)	- 1 M 100 µg/ml 15 g/L	Selección de clones recombinantes resistentes a Zeocina.
MD	YNB Biotina Glucosa Agar (sólo medio sólido)	1,34% 4x10 ⁻⁵ % 2% 15 g/L	Determinación del fenotipo Mut
MM	YNB Biotina Metanol Agar (sólo medio sólido)	1,34% 4x10 ⁻⁵ % 0,5% 15 g/L	Determinación del fenotipo Mut y expresión intracelular de proteínas recombinantes
MGY	YNB Glicerol Biotina	1,34 % (v/v) 0,5% (v/v) 4x10 ⁻⁵ % (v/v)	Medio mínimo no tamponado para generación de biomasa antes de la inducción con metanol
BMGY	Extracto de levadura Peptona YNB Fosfato potásico pH 6 Biotina Glicerol	10 g/L 20 g/L 1,34% (v/v) 100 mM 4x10 ⁻⁵ % (v/v) 0,5% (v/v)	Medio complejo y tamponado para la generación de biomasa antes de la inducción con metanol
BMMY	Extracto de levadura Peptona YNB Fosfato potásico pH 6 Biotina Metanol	10 g/L 20 g/L 1,34 % (v/v) 100 mM 4x10 ⁻⁵ % (v/v) 0,5% (v/v)	Medio complejo y tamponado para la expresión intracelular y secretora de proteínas recombinantes

Tabla 3.2. Medios de cultivo empleados para el crecimiento y experimentos realizados en levaduras.

<i>Medio</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Suplementos opcionales</i>	<i>Aplicación</i>
Medio de Grace, suplementado	GIBCO	SFB 10% (inactivado por calor) Penicilina/Estreptomina (1%) L-Glutamina (1%)	Obtención de baculovirus recombinantes en células de insecto Sf21.
Medio libre de suero Sf-900 II	GIBCO	SFB 10% (inactivado por calor)	Crecimiento y mantenimiento de células de insecto, e infección de cultivos para obtención de proteína.

Tabla 3.3. Medios comerciales empleados en el cultivo de células de insecto y experimentos realizados con las mismas. SFB: Suero Fetal Bovino.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Crecimiento y mantenimiento de cultivos

3.2.1.1 Crecimiento y mantenimiento de cultivos bacterianos

El crecimiento de las distintas cepas bacterianas se realizó, salvo excepciones, en medio LB o SOB líquido, a 37°C y en agitación a 250 rpm en un incubador de agua. Para la selección y mantenimiento de la presión selectiva de clones recombinantes se añadió el antibiótico ampicilina (Sigma) a concentración 100 µg/ml o el antibiótico Zeocina (Invitrogen) a concentración 25 µg/ml.

El mantenimiento de las distintas cepas bacterianas y clones recombinantes se realizó en medio LB, en presencia de glicerol 15%, manteniéndose a -20 y/o -80°C.

3.2.1.2 Crecimiento y mantenimiento de cepas de levaduras

El crecimiento de las distintas cepas de levaduras, se desarrolló en medio YPD líquido en agitación (150-170 rpm) y en medio YPDS sólido a 28-30°C. Para la selección y mantenimiento de clones recombinantes se añadió zeocina (100 µg/ml).

El mantenimiento de las cepas de levaduras se realizó en alícuotas de 1ml en medio YPD o YPD+zeocina (para los clones recombinantes), en presencia de glicerol al 15%. Las alícuotas se mantuvieron a -20 y -80°C.

3.2.1.3 Crecimiento y mantenimiento de células de insecto

Los cultivos de células de insecto se realizaron en erlenmeyer de 50 ml o fermentadores de 250 ml (volúmenes de trabajo) en agitación a 90 ó 150 rpm respectivamente, a una temperatura de 27°C, en medio de Grace suplementado o en medio Sf-900 II (Tabla 3.3).

El stock de células de insecto se realizó en medio de congelación (medio de Grace al 60%, SFB al 30%, DMSO al 10%) o bien en SFB al 90% + DMSO al 10%.

3.2.2 Extracciones de ácidos nucleicos

3.2.2.1 Extracción de ADN plasmídico de bacterias

La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit comercial *QIAprep spin miniprep* (QIAGEN), basado en un método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979) modificado, seguido de la adsorción del ADN a una membrana de sílice, en presencia de altas concentraciones de sal. El ADN se eluyó en agua destilada.

3.2.2.2 Extracción de ADN total de levaduras

Para la extracción de ADN total de levaduras, se realizaron cultivos de 48-60 horas a 28°C y con agitación (150 rpm), empleando medio YPD (para cepas silvestres) o YPD con zeocina a 100 µg/ml (para clones recombinantes). Las células fueron recogidas mediante centrifugación a la máxima velocidad en microfuga (Microfuge Pico, Heraeus). Tras dos lavados con agua destilada, se resuspendieron en 500 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 0,1M pH 8,8; EDTA 50 mM; SDS al 1%) al que se añadieron 25µl de NaCl 5M.

A la suspensión resultante, se le añadieron 5 perlas de vidrio (0,5 mm), y la ruptura de las células se llevó a cabo mediante 5 ciclos (20 segundos) de agitación en vortex, a la máxima potencia, en frío. Los lisados se centrifugaron durante 2 minutos a la máxima velocidad. Los sobrenadantes purificados mediante fenolización y precipitados en etanol (apartado 3.2.2.5) se resuspendieron en 50 µl de agua destilada estéril y se trataron con RNasa A (400 µg/ml) durante 1 hora a 37°C.

3.2.2.3 Extracción de ADN total de células de insecto

Las células de insecto se resuspendieron en 250 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 10 mM). A continuación se añadieron 250 µl de Tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 10 mM; β-mercaptoetanol 5%; SDS 0,4%), 6,5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 1 µl de RNasa (10 mg/ml). La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos.

El ADN fue fenolizado y precipitado en etanol (apartado 3.2.2.5), resuspendiéndose en 50 µl de agua destilada estéril.

3.2.2.4 Extracción de ARN total de levaduras

Para la extracción de ARN total de las células de levadura, se tomaron alícuotas de 15 ml (cepa X-33) y de 10 ml (cepa KM71H) de cultivo inducido en medio BMMY.

Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3250 xg durante 10 minutos a 4°C y a continuación fueron resuspendidas en 250 µl de tampón LETS (Cloruro de Litio 0,1M; EDTA-Na₂ 0,1M; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; SDS al 0,2%). La suspensión celular se transfirió a un tubo eppendorf que contenía 1g de perlas de vidrio (~0,5mm), y 350 µl de Fenol equilibrado con tampón LETS. La lisis se realizó mediante agitación en vortex a potencia máxima (8 pulsos, 30 segundos), en frío. Los lisados se centrifugaron a 5000 xg durante 5 minutos. La fase superior acuosa se sometió a una nueva extracción con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), y a una posterior extracción con cloroformo.

La fase acuosa se sometió a precipitación con 0,1 volúmenes de LiCl 5M durante toda la noche a -20°C. Transcurrido este tiempo los tubos se centrifugaron a 17950 xg durante 20 minutos (+4°C) y se retiró el sobrenadante. El sedimento fue lavado con 500 µl de Etanol 70% frío (-20°C) y se resuspendió en agua tratada con DEPC.

Las muestras fueron tratadas entonces con DNasa I (Ambion) para eliminar las trazas de ADN contaminante. Se emplearon 4U de DNasa por cada 300 ng de ARN total. El tratamiento se desarrolló durante 30 minutos a 37°C. A continuación se procedió a la inactivación de la DNasa, mediante precipitación con 0,1 volúmenes del reactivo de inactivación de DNasas (Ambion). El ARN tratado fue almacenado a - 80°C hasta su uso.

3.2.2.5 Purificación de ADN mediante fenolización y precipitación con Etanol/Acetato sódico o amónico

Para purificar el ADN, se le añadió a la muestra un volumen igual de solución fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), y se mezcló vigorosamente en vortex. A continuación la muestra se centrifugó a máxima velocidad en microfuga. La fase superior fue recuperada y trasladada a un tubo limpio realizándose una segunda purificación con un volumen de cloroformo. Nuevamente ambas fases se mezclaron por agitación en vortex y la mezcla se centrifugó a máxima velocidad. La fase superior

acuosa fue recogida y sometida a precipitación mediante adición de 2,5 volúmenes de etanol 100% frío (-20°C) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M, pH 5,4, o acetato amónico 7,5 M pH 7,4 en el caso de extracciones de ácidos nucleicos de levaduras. La precipitación se desarrolló durante 1-2 horas a -80°C, o a -20°C durante toda la noche. A continuación las muestras se sometieron a centrifugación a máxima velocidad (13000 rpm) a +4°C durante 20-30 minutos. Transcurrido este tiempo, los sedimentos fueron lavados con 500 µl de etanol 70% frío (-20°C), centrifugando a máxima velocidad durante 10-15 minutos. Los sedimentos de ADN se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron resuspendidos en los correspondientes volúmenes de agua.

3.2.3 Amplificaciones de ácidos nucleicos mediante PCR

3.2.3.1 Amplificación de la región L1 de VPH18 para expresión en sistemas heterólogos

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en volúmenes de 50 µl, en tubos eppendorf de 0,2 ml de capacidad. Las mezclas de reacción consistieron en: Tampón 1X Gene Amp II (Tris HCl 10mM pH 8,3; KCl 50 mM) (Applied biosystems); MgCl₂ a concentración final variable (entre 1,7 y 4 mM); mezcla de dNTPs (Roche, Fermentas) a concentración final variable (entre 0,5 y 2 mM); cebadores (0,5 µM); y 1,25 U de ADN polimerasa (AmpliTaq DNA polymerase, Applied Biosystems). Las cantidades de ADN fueron aproximadamente: 10-100 ng de ADN plasmídico, 100 ng de ADNc, 10-100 ng ADN total de levaduras y 100 ng de ADN de células de insecto. En las amplificaciones con la pareja FW18MO/RW18MO, y 18L1FD2/18L1RD2 se empleó la polimerasa *Expand Long Template* (Roche) (3,75 U/reacción), en Tampón 2 suministrado por la casa comercial.

Cuando las amplificaciones se realizaron directamente a partir de colonias de levaduras, éstas fueron picadas con puntas estériles, resuspendidas en 10 µl de agua estéril, y hervidas durante 7 minutos, añadiéndose directamente 5 µl de la suspensión al tubo de PCR.

En todas las reacciones de PCR, se incorporó un tubo de control de contaminación, al que no se añadía ADN. Las reacciones de amplificación se realizaron en termociclador *MasterCycler Gradient* (Eppendorf). Los productos de PCR fueron conservados a +4°C hasta su uso. Las parejas de cebadores empleadas en las

Materiales y Métodos

amplificaciones se recogen en la Tabla 3.4. Las reacciones de PCR, salvo excepciones, se realizaron en las condiciones que se muestran en las tablas 3.5 y 3.6.

Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Localización (pb)	Situación	Tamaño amplificación
FW18MO	CTATTGCACCTTCCCCAGAA	20	51,7	5217 / 5236	Externos región L1	2160 pb
RW18MO	ATAGCCCAACAAGCAACACC	20	51,7	7357 / 7376		
PV18F2-L	AGAATTCGTCCTTTAACCTCCTCT	25	50,9	5401 / 5425	Externos región L1	1857 pb
PV18R2-L	<i>EcoRI</i> ACTCGAGACATACAACATACAACAACAA CCAT <i>XhoI</i>	32	54,2	7226 / 7257		
L1EXTFWC	CACTATATCTTCTGCCTCTTCTTA	24	48,9	5371 / 5394	Externos región L1	1879 pb
L1EXTRWC	CATACAACATACAACAACAACCAT	24	48,8	7226 / 7249		
18L1FWn	GTATATCTTCCACCTCCTTCT	21	43,6	5643 / 5663	Región L1	1491 pb
18L1FRn	CTTCTGGCACGTACACGCAC	21	57,8	7113 / 7133		
18L1FD2	AGAATTCGTATATCTTCCACCTCCT	25	49,3	5636 / 5660	Región L1	1504 pb
18L1RD2	<i>EcoRI</i> CTCGAGCTTCCTGGCACGTACACGCAC <i>XhoI</i>	27	60,7	7113 / 7139		
MY11	GCMCAGGGWCATAAAYAATGG	20	50,1	6558 / 6577	Región L1	455 pb
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	20	50,8	6993 / 7012		
PV18F2M1-2	AGAATTCCTCTTATAATGTCTGTATAC ACG	32	52,9	5415 / 5446	Región L1	1738 pb
PV18R2M2-2	<i>EcoRI</i> ATAGTTAGCGGCCGCTTACTTCCTGGCA CGT	32	78,2	7121 / 7144		
PV18R2M3-2	<i>NotI</i> CTAGAAAGCTGGCGGCCGCTTCCTGGC ACCT <i>NotI</i>	32	80,8	7121 / 7144		
18L1FWBP	AGAATTCAGATGGCTTTGT	20	42,6	5610 / 5622	Región L1	1542 pb
18L1RVBP2	<i>EcoRI</i> CCGCTCGAGTTACTTCCTGGCACG <i>XhoI</i>	24		7122 / 7136		
AOXL1-7A	GTCCTGATATTACATTACCATCTAC	25	46,00	5449/5472	Región L1	703 pb
AOXL1-8	AAGGACGCGATTTACAAGCAGTG	23	57,3	6128 / 6150		
18L1F600	TTCTGAGGACGTTAGGACAATG	23	67,0	6029 / 6051	Región L1	122 pb
AOXL1-8	AAGGACGCGATTTACAAGCAGTG	23	57,3	6128 / 6150		
TEFFW3	CAACGCCAGGTCATTATCTT	21	53,3	1441 / 1461	Factor de elongación <i>P. pastoris</i>	140 pb
TEFRV3	TCTTCTTACCGGTTCTTCTGTCA	23	52,5	1558 / 1580		
5'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21	51,2	855 / 875	Vectores pPICZ y pPICZα	1850 y 2062 pb en pPICZ, 2320 pb en pPICZα
3'AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21	54,3	1159 / 1179		
Bac1	ACCATCTCGAAATAAATAAG	21	57,3	1182 / 1202	Vectores pBacPAK	1719 pb
Bac2	ACAACGCACAGAATCTAGCG	20	63,0	1358 / 1377		

Tabla 3.4. Parejas de cebadores empleados en la amplificación de la región L1 de VPH18, para la obtención de las secuencias utilizadas en las diversas construcciones realizadas, y amplificación de ADNc. Las celdas sombreadas corresponden a oligonucleótidos comerciales. Para cebadores degenerados: M=A+C; R=A+G; W=A+T; Y=C+T.

Etapas	Temperatura	Pareja de cebadores	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94-95°C	-	5 min	1
Desnaturalización	94-95°C	-	1 min a 30 seg	30 ¹
Hibridación	45°C	MY11/18L1FRn	1 min a 30 seg	
		18L1FD2/18L1RD2		
		BAC1/BAC2		
	50°C	FW18MO/RW18MO		
		18L1FWBP/ 18L1RVBP2		
	55°C	18L1F600/AOXL1-8		
		TEFFW3/TEFRV3		
		AOXL1-7A/ AOXL1-8		
		5'AOX1/AOXL1-8		
Polimerización	72°C	-	1-2 min	
Extensión final	72°C	-	5 a 7 min	1

Tabla 3.5. Programas de amplificación por PCR. 1: Con excepción de las amplificaciones realizadas con las parejas MY11/18L1FRn (35 ciclos) y BAC1/BAC1 (25 ciclos).

PCR con cebador directo			
Etapas	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	20
Hibridación	45°C	30 seg	
Polimerización	72°C	2 min	
Adición de cebador reverso			
Desnaturalización	94°C	30 seg	20
Hibridación	55°C	30 seg	
Polimerización	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	5 min	1

Tabla 3.6. Condiciones especiales de PCR para la pareja PV18F2M1-2/ PV18R2M2-2 y la pareja PV18F2M1-2/ PV18R2M3-2.

3.2.3.2 Purificación de productos de PCR

Para la purificación de los productos de PCR se utilizaron las unidades Microcon YM-100 (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.4 Secuenciación

Se empleó el método de Sanger o de los terminadores de cadena, basado en la utilización de ddNTPs. Para ello se utilizó el kit comercial *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems).

En cada reacción se emplearon aproximadamente 100 ng de ADN en el caso de tratarse de ADN plasmídico, y 100 ng por cada 1000 pb en el caso de tratarse de

Material y Métodos

productos de PCR purificados. Los oligonucleótidos utilizados en estas reacciones (Tabla 3.8, Figura 3.1) fueron añadidos a una concentración de 3,2 pmoles/μl.

Los tubos se sometieron a los ciclos de amplificación indicados en la Tabla 3.7.

Paso	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización	96°C	10 seg	25
Hibridación	40 /45°C	5 seg	
Polimerización	72°C	4 min	

Tabla 3.7. Ciclos de amplificación llevados a cabo en la PCR específica para la secuenciación de ácidos nucleicos.

Las muestras ya amplificadas se remitieron al Servicio de secuenciación del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII). La lectura de cada secuencia se realizó en un secuenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems). También se utilizó el servicio de secuenciación del centro de genómica y proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, en cuyo caso las muestras de ADN fueron directamente remitidas a dicho servicio para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante los programas Chromas versión 1.55 (Technelysium Pty, Ltd) y DNASTar (Lasergene) y editadas con el programa BioEdit. Por último se compararon con los bancos de datos EMBL y GenBank utilizando diferentes versiones de la herramienta BLAST.

Situación de los cebadores		Cebador	Secuencia 5' → 3'	Tamaño (bases)	Tm (°C)	Localización (pb)
Vector	pGEX	5' pGEX	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	23	78,5	869 / 891
		3' pGEX	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	23	75,9	1041 / 1019
	pPICZ y pPICZα	5' AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21	63,4	855 / 875
		3' AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21	66,4	1159 / 1179
	pBacPAK 8 y 9	BAC1	ACCATCTCGCAAATAAATAAG	21	57,3	1182/1202
		BAC2	ACAACGCACAGAATCTAGCG	20	63,0	1358/1377
Región L1 VPH18		18L1F600	TTCTGAGGACGTTAGGGACAATG	23	67,0	6029 / 6051
		18L1F700	AGTATAGCAGACATGTTGAGGAAT	24	59,6	6700 / 6723
		18L1F800	CGTCGCAAGCCCACCATAG	19	68,8	7038 / 7056
		ForwardT	GTACCATTGGATATTTGT	18	48,9	6270 / 6287
		MY11	GCMCAGGGWCATAAAYAATGG	20	50,1	6558 / 6577
		MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	20	50,8	6993 / 7012
		18L1FRn	CTTCCTGGCACGTACACGCAC	21	57,8	7113 / 7133
		AOXL1-8	AAGGACGCGATTACAAGCAGTG	23	57,3	6128 / 6150

Tabla 3.8. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de secuenciación. M: A+C; R: A+G; W: A+T; Y: C+T.

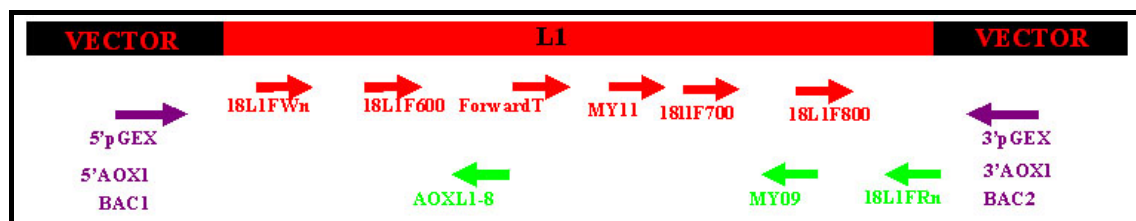


Figura 3.1. Representación esquemática de los oligonucleótidos empleados para las secuenciaciones de las distintas construcciones. Los oligonucleótidos se describen en las tablas 3.4 y 3.8.

3.2.5 Retrotranscripción

Para la obtención de ADNc a partir de aislamientos de ARN de *P. pastoris*, se llevó a cabo la técnica de RT-PCR empleando el sistema comercial *First strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV)* (Roche Applied Science). Se basa en la utilización de la retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) que es estable a temperaturas mayores que otras retrotranscriptasas, por lo que la reacción se realiza a 42°C. Esto permite obtener una mayor especificidad y resolución de las estructuras secundarias, que cuando se trabaja a temperaturas de 37°C.

Para realizar la reacción de retrotranscripción, se siguieron las recomendaciones del fabricante, empleándose hexámeros al azar como cebadores. En cada reacción se añadió 1 µg de ARN total aislado de cultivos de levaduras tratado con DNasa I para eliminar las trazas de ADN contaminante (ver apartado 3.2.2.4).

3.2.6 Digestiones enzimáticas de ácidos nucleicos

Las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo empleando las enzimas *EcoRI*, *XhoI* y *NotI* (Roche Applied Science), y *PmeI* (New England Biolabs). Se utilizaron los tampones recomendados por la casa comercial para cada una de las endonucleasas. Las reacciones de digestión se desarrollaron a 37°C durante 1,5-3 horas, o hasta 20 horas en el caso de algunas reacciones que implicaban el uso de las endonucleasas *NotI* o *PmeI*.

3.2.7 Análisis electroforético de ácidos nucleicos

3.2.7.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se realizaron geles de agarosa D-1 (Pronadisa), a concentraciones de 0,7 al 2% en función del tamaño esperado de los fragmentos a analizar. La suspensión de agarosa

se realizó en TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM, pH 8) a la que se añadió, o no, bromuro de etidio a una concentración final de 0,8 µg/ml.

Como tampón de carga se utilizó una solución 6X comercial (Fermentas) compuesta por: Tris-HCl 10 mM (pH 7,6); azul de bromofenol al 0,03%(v/v); xilencianol FF al 0,03%(v/v); glicerol al 60% (v/v) y EDTA 60 mM. Se emplearon distintos marcadores de peso molecular: *Gene Ruler 100bp* y *100bp Plus* (Fermentas) y λ /*HindIII* (Biotools).

La separación electroforética se realizó en cubetas Bio-Rad, a voltaje constante, empleando tampón TAE 1X.

En el caso de ser necesaria la tinción del gel de agarosa, ésta se realizó en una solución de EtBr (0,8 µg/ml) en agua destilada durante 5 minutos. El gel fue desteñido en agua destilada, durante 30 minutos.

Los geles fueron observados mediante exposición a luz ultravioleta en un transiluminador conectado a un sistema de captura e impresión de imágenes (Vilber Lourmat).

3.2.7.2 Electroforesis de ARN en geles de agarosa

El análisis de las extracciones de ARN se realizó en geles de agarosa D-1, al 1-1,5%. La suspensión de la agarosa se realizó en tampón MOPS 1X pH 5,8, (MOPS 0,02M; Acetato sódico 5 mM; EDTA 0,001 M). Como tampón de carga 2X, se empleó una solución compuesta por formamida al 50% (v/v); formaldehído al 17% (v/v); tampón MOPS 1X; glicerol al 5,3% (v/v) y solución saturada de azul de bromofenol al 5,3% (v/v).

Para la preparación del gel, a la suspensión de agarosa atemperada a 50°C se añadió formaldehído a concentración final 2%. La mezcla se añadió entonces al soporte adecuado, previamente tratado, al igual que la cubeta de electroforesis, con SDS al 1%, durante una noche, para eliminar las ribonucleasas, y aclarado con agua destilada DEPC.

Las muestras de ARN fueron calentadas a 65°C durante 10 minutos, para eliminar las estructuras secundarias, y pasadas a hielo de forma inmediata. La separación electroforética se realizó a voltaje constante (100V) durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos. El gel de agarosa se tiñó con una solución de

bromuro de etidio (0,8 µg/ml) en agua destilada, durante 15 minutos y posteriormente se destiñó en agua destilada durante una hora.

Los geles fueron observados del mismo modo descrito anteriormente para el análisis electroforético de ADN.

3.2.7.3 Extracción de ADN de geles de agarosa

Las extracciones de ADN de geles de agarosa se realizaron utilizando el sistema comercial *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) diseñado para extraer y purificar los fragmentos de ADN de entre 70pb y 10 Kpb en geles de agarosa.

Las bandas de interés (identificadas por su tamaño cuando los geles se observaban bajo luz ultravioleta) se cortaron mediante la utilización de un bisturí, y a continuación se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante. Las muestras se eluyeron en un volumen final de 30 µl de H₂O destilada estéril, o bien en 80 µl, en cuyo caso fueron precipitadas en etanol (apartado 3.2.2.5), manteniéndose a -20°C hasta su posterior utilización.

3.2.8 Medida de la concentración y pureza de ácidos nucleicos

Los métodos que se han empleado para la estimación de la concentración y pureza de los ácidos nucleicos en este trabajo son los descritos por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989).

Las concentraciones de ADN y ARN se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm y, empleando las siguientes fórmulas:

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times F_d$$

$$[\text{ARN}] = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times F_d$$

siendo F_d = Factor de dilución.

La medida de A_{260} se obtuvo en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-160A, o en el aparato Nanodrop ND-100 (Nanodrop *Technologies*). Como blanco se utilizó, salvo excepción, agua destilada estéril, o agua *Milli-Q* (Millipore) estéril.

El grado de pureza de las muestras, se determinó mediante el cociente A_{260}/A_{280} que debió estar comprendido entre 1,8-2.

3.2.9 Reacciones de ligación en vectores de clonación

Para la reacción de ligación en el vector pCR 2.1-TOPO, se siguieron las recomendaciones ofrecidas por el fabricante. En cada reacción se emplearon de 0,5 a 4 µl del producto de PCR en función de la concentración.

Para las reacciones de ligación en el resto de vectores (pGEX-4T, pPICZ, pPICZα, pCDNA 3.1 (+) y pBacPAK9), éstos y los productos de PCR fueron digeridos con las endonucleasas de restricción apropiadas en cada caso.

Para evitar la religación, los vectores fueron defosforilados mediante tratamiento con la enzima fosfatasa alcalina de gamba (Roche Applied Sciences). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 100 µl. Se utilizó 1U de enzima por reacción, en el tampón suministrado por la casa comercial. La defosforilación se desarrolló durante 1 hora a 37°C y la enzima se inactivó mediante incubación a 65°C durante 15 minutos, procediéndose a la posterior purificación y precipitación del vector (apartado 3.2.2.5).

Para la reacción de ligación se empleó 1 U de ADN ligasa del fago T4 (Roche Applied Sciences) en un volumen final de 10 µl, ligándose inserto y vector a una relación molar 3:1 en el tampón suministrado por la casa comercial, a +15°C durante 12 horas.

A continuación, con los productos de ligación, se llevó a cabo la transformación de células de *E. coli* BL21, C41(DE3), C43 (DE3), TOP10F' o XL1-Blue químicamente competentes (apartado 3.2.11.1).

3.2.10 Obtención de células competentes

La inducción del estado de competencia de las células se realizó mediante el método del cloruro cálcico (Sambrook *et al.*, 1989). Las bacterias competentes se distribuyeron en alícuotas de 200 µl y se mantuvieron durante toda la noche en un baño de hielo a +4°C, para incrementar la eficiencia de transformación. Las alícuotas no utilizadas en el momento se sometieron a congelación a -80°C con glicerol al 15%.

3.2.11 Transformación de células procariotas y eucariotas

3.2.11.1 Transformación de *E. coli* mediante choque térmico

Para realizar las transformaciones en las distintas cepas de *E. coli* químicamente competentes se utilizaron de 100 a 200 ng de los productos de ligación correspondientes. La mezcla fue incubada en hielo durante 30 minutos. Tras este periodo, se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 30 segundos y se pasaron rápidamente a hielo. A continuación se añadieron 250 a 1000 µl de medio S.O.C. y las células transformadas se incubaron durante 1 hora en un baño a 37°C.

Transcurrido este tiempo, se sembraron en placas de LB+Ampicilina (100 µg/ml) para los vectores pGEX 4T, pcDNA3.1 y pBacPAK9, a las que se añadieron previamente 40 µl de X-Gal (40 µg/ml) sólo en el caso de las transformaciones realizadas con el vector pCR 2.1-TOPO; o en placas de LB+Zeocina (25 µg/ml) para los vectores pPICZ y pPICZα. Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias de un tamaño adecuado.

3.2.11.2 Transformación de cepas de *P. pastoris* mediante electroporación

Para facilitar los fenómenos de recombinación entre regiones homólogas existentes en el vector y en el ADN genómico de las levaduras, los vectores empleados para la transformación de cepas de *P. pastoris* fueron linealizados mediante digestión con la enzima *PmeI* (apartado 3.2.6) y purificados mediante extracción con fenol cloroformo y precipitación con etanol (apartado 3.2.2.5).

Se prepararon preinóculos de 5ml (en tubos cónicos de 50 ml) de las cepas X-33 y KM71H de *P. pastoris*, que fueron incubados en medio YPD durante toda la noche a 28°C con agitación a 150 rpm. 500 µl del preinóculo fueron utilizados para inocular matraces de 1 L que contenían 250 ml de YPD. Los cultivos fueron incubados nuevamente hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1,3-1,5. Las células fueron entonces recogidas mediante centrifugación a 1500 xg durante 5 minutos a +4°C lavándose 2 veces en agua destilada estéril fría (0°C) y una en sorbitol 1M (0°C). Finalmente las células se resuspendieron en 1,5 ml de sorbitol 1M frío (0°C).

La transformación se realizó por electroporación en frío de 80 µl de la suspensión celular en presencia de 5-10 µg de la construcción linealizada

correspondiente, en las siguientes condiciones: 15 KV, 25 μ F y 200 Ω , durante 4-5 milisegundos.

Inmediatamente finalizada la electroporación, se añadió a la cubeta 1 ml de sorbitol 1M y la suspensión resultante fue transferida a un tubo estéril e incubada a 30°C durante 2 horas, sin agitación. A continuación se sembraron 100, 200 y 800 μ l del cultivo de células transformadas en placas de YPDS conteniendo 100 μ g/ml de Zeocina. Las placas fueron incubadas durante a 28°C hasta observar la aparición de colonias.

3.2.12 Generación de baculovirus recombinantes en células de insecto

Para producir un baculovirus recombinante, el gen de interés es clonado primero en un vector de transferencia (pBacPAK9) que contiene el promotor para la polihedrina (de expresión tardía) seguido de un sitio de clonaje múltiple donde se inserta el gen de interés (Figura 3.2). El gen queda así flanqueado en los extremos (3' y 5') por secuencias virales.

El vector de transferencia recombinante se usa para cotransfectar células junto con un ADN viral silvestre, de manera que los fenómenos de recombinación homóloga entre ambos llevarán a la sustitución del gen de la polihedrina por el gen de interés. En la actualidad, para facilitar la recombinación homóloga, el ADN viral empleado está digerido con la enzima *Bsu36I*, interrumpiéndose un gen esencial para la replicación viral, situado corriente abajo del gen de la polihedrina (Kitts & Possee, 1993). Así cuando las células se cotransfectan con los vectores de transferencia recombinantes y el ADN viral linealizado, la recombinación homóloga restaura la secuencia que codifica al gen esencial (proporcionado por el vector de transferencia), haciendo que más del 99,9% de la progenie viral derivada de las cotransfecciones, sea recombinante y por tanto posea el gen de interés.

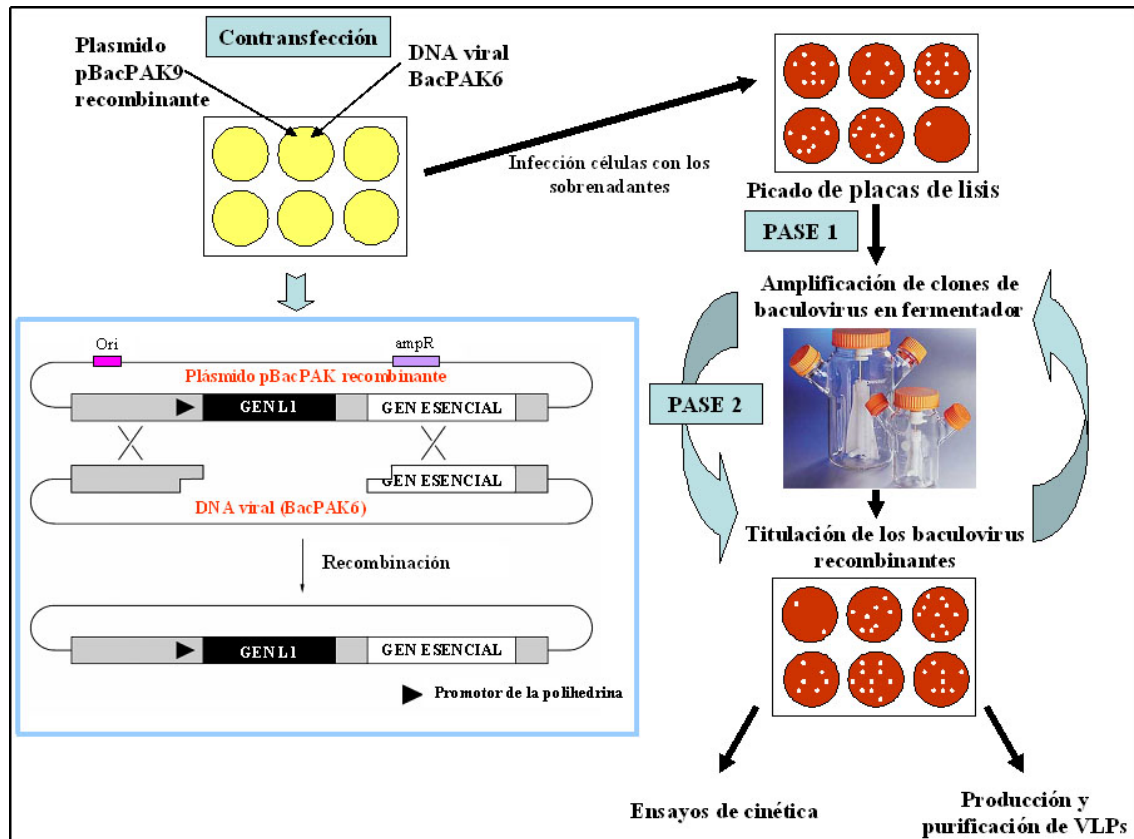


Figura 3.2. Esquema de pasos seguidos para la obtención de baculovirus recombinantes.

a) Cotransfección de células de insecto

Para todo el proceso, se emplearon microplacas multipocillo (6 pocillos de 35 mm, Nunc) sembradas con 1×10^6 células Sf21 por pocillo en medio básico de Grace suplementado (Tabla 3.3). La microplaca se incubó durante 1-4 horas a 27°C para permitir la adhesión de las células. Tras la retirada del medio y el lavado de los pocillos, se añadió a cada uno medio de Grace no suplementado, infectándose con las mezclas de reacción (500 ng de plásmido pBacPAK9 recombinante + 5 µl del ADN viral BacPAK6 predigerido con *Bsu36I* en presencia de Bacfectina), incubándose la microplaca a 27°C durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, se añadieron 1,5 ml de medio completo a cada pocillo y la incubación continuó durante 3 días más a 27°C. Como control positivo se empleó el vector pBacPAK8-GUS (apartado 3.1.4), al que se añadió además una solución del sustrato X-GLUC (Fermentas) a 300 µg/ml. Como control negativo, se empleó un tubo con ADN plasmídico recombinante y sin ADN viral. Pasado el tiempo de incubación, se aspiraron los sobrenadantes que contendrían los baculovirus y se almacenaron a 4°C. De forma opcional, a cada uno de los pocillos se añadieron 1,5 ml

de medio completo nuevo y la microplaca se volvió a incubar durante 2-3 días más en las mismas condiciones, para obtener más baculovirus recombinantes.

b) Aislamiento de clones de baculovirus recombinantes

Las microplacas sembradas fueron infectadas con 200 μ l de diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) de los sobrenadantes conteniendo baculovirus recombinantes (diluidos en medio de Grace completo). Como controles positivos de la infección se realizaron diluciones 10^{-5} y 10^{-6} del baculovirus BacPAK6. Las microplacas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se aspiró el inóculo viral y se añadieron 1,5 ml de una cubierta de agarosa (Seakem) al 0,5%, preparada en medio de Grace completo atemperado. A continuación, las microplacas se incubaron a 27°C durante 5 días.

Las placas de lisis fueron teñidas mediante la adición de 1,5 ml de una cubierta de colorante Rojo neutro (Sigma). La cubierta de agarosa se preparó de la misma forma arriba mencionada, añadiendo 15 μ l de colorante por cada ml de agarosa al 0,5%. Las microplacas fueron incubadas durante 24 horas a 27°C, para permitir el desarrollo de las placas de lisis que se identificaron como puntos transparentes sobre fondo rojo. Se picaron diversas placas de lisis y se resuspendieron en 0,5 ml de medio de Grace completo. La suspensión se agitó en vortex, y a continuación se mantuvo a 4°C durante toda la noche para permitir que los virus difundieran al medio.

c) Amplificación de baculovirus recombinantes

La amplificación de los clones de baculovirus recombinantes, se realizó en microplacas, infectando pocillos con 5×10^5 células en medio de Grace completo. La infección se realizó con 100 μ l de los sobrenadantes obtenidos en el paso anterior. Como control positivo, uno de los pocillos se infectó con 100 μ l de una dilución 10^{-4} del baculovirus BacPAK6. Como control negativo otro pocillo fue inoculado con 100 μ l de medio Grace completo. Las microplacas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se añadieron 2 ml de medio completo a cada pocillo y se incubaron a 28°C durante 3-4 días.

El medio de cada uno de los pocillos, que contendría los baculovirus recombinantes, fue recuperado y almacenado a +4°C, siendo denominado PASE 1.

Para amplificar el PASE 1, se inocularon fermentadores (100 ml), conteniendo un cultivo de células Sf21 ($0,5 \times 10^6$ células/ml) en medio de Grace completo, con el

volumen correspondiente de pase 1 necesario para infectar las células a un Índice de Multiplicidad de la Infección (MOI) de 0,1 ufp/célula (0,1 virus por cada célula). La infección se mantuvo durante 5-6 días. El cultivo infectado se centrifugó a 1000 xg durante 5 minutos para eliminar las células y restos celulares. El sobrenadante fue almacenado a +4°C y rotulado como PASE 2 del stock viral.

La amplificación de baculovirus recombinantes para obtención de más stock se realizó en fermentadores de 250 ml de volumen de trabajo, infectándose cultivos de 1×10^6 células/ml de células Sf21 en presencia de SFB al 10%, y con un MOI de 0,1. Las infecciones se desarrollaron a 27°C, en agitación (150 rpm), controlándose la densidad celular, así como la viabilidad, diariamente y se detuvieron cuando esta última estuvo en torno al 50% (generalmente 5-6 días después de la infección).

La titulación de stocks de baculovirus recombinantes se realizó mediante ensayo de placas. Las microplacas sembradas con 2,5 ml de una suspensión de células Sf21 en medio de Grace completo o Sf900-II completo, se infectaron y revelaron del mismo modo descrito para el aislamiento de baculovirus recombinantes.

3.2.13 Obtención de sueros hiperinmunes de ratón

Para la obtención de sueros hiperinmunes de ratón, se trabajó con hembras BALB/c de 8 semanas, amablemente cedidas por el Animalario del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII).

Antes del inicio de cada experimento de inmunización, se tomaron muestras de sangre para obtener sueros control preinmunes. La sangre, en este caso, se obtuvo mediante punción del plexo retro-orbital.

Para la obtención de sueros, tanto control como hiperinmunes, se permitió que la sangre coagulara reposando a temperatura ambiente. Una vez formado el coágulo la muestra fue centrifugada en microfuga a 8000 rpm durante 3-5 minutos, y el sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta su uso.

3.2.13.1 Obtención de sueros mediante inmunización con la proteína GST-18L1Ct

Para la obtención de sueros hiperinmunes en ratones, mediante inmunización con la proteína recombinante GST-18L1Ct, se emplearon proteínas purificadas mediante cromatografía de afinidad con glutation en suspensión, y sometidas a

electroelución en PBS (apartado 3.2.14.1) previa separación electroforética. La proteína purificada fue empleada para inmunizar 5 ratones.

Las inoculaciones se realizaron vía subcutánea. Cada animal, previamente sedado mediante inhalación de éter, recibió 3 dosis de 30-40µg de proteína purificada, separadas en un período de 21 días cada una de ellas. En la primera dosis el antígeno fue administrado junto con adyuvante completo de Freund (1:1), y junto con adyuvante incompleto de Freund en las dos siguientes.

Transcurridos 21 días después de la última inmunización, los animales fueron sacrificados para la obtención de toda la sangre.

3.2.13.2 Obtención de sueros hiperinmunes mediante inmunización con ADN

Para llevar a cabo la obtención de sueros hiperinmunes de ratón con ADN, se realizaron dos aproximaciones:

1. En este caso, en cada inoculación, cada ratón recibió una dosis de 100 µg de ADN plasmídico recombinante (región L1 completa de VPH18, obtenida mediante amplificación con los cebadores PV18L1F2M1-2/PV18R2M2-2 y clonada en el vector pCDNA 3.1), no empleándose adyuvantes. Las inoculaciones se realizaron vía intramuscular (plexo inguinal), llevándose a cabo tres inmunizaciones separadas en periodos de 21 días.

2. Se utilizó el protocolo descrito por Bates y colaboradores (Bates *et al.*, 2006). En este caso se efectuaron inoculaciones semanales, hasta un total de 5, realizándose el sangrado de los animales, una semana después de la última inmunización. El antígeno fue inyectado utilizando solución Ringers (Oxoid) como diluyente, y las inoculaciones fueron realizadas vía intravenosa (vena lateral de la cola), sin utilización de adyuvantes. En cada inoculación se administraron aproximadamente 20 µg del mismo ADN que en el caso anterior.

3.2.14 Ensayos de expresión y purificación de proteínas recombinantes

3.2.14.1 Ensayos de expresión de proteínas de fusión en *E. coli*

a) Inducción de los cultivos para expresión de proteínas recombinantes

Las inducciones se realizaron sobre cultivos de distintos volúmenes (Figura 3.3) crecidos en medio LB o SOB suplementados con ampicilina (Tabla 3.1), según se indica en el apartado 3.2.1.1.

La expresión de la proteína se desarrolló en diferentes volúmenes de cultivo:

- Minicultivos: 10 ml de medio de cultivo, dispuestos en tubos falcon de 50 ml.
- Midicultivos: 25 ml de medio de cultivo, dispuestos en erlenmeyer de 250 ml.
- Maxicultivos: 250ml de medio de cultivo, dispuestos en erlenmeyer de 1000 ml.

Los cultivos fueron incubados hasta alcanzar la D.O.₆₀₀ deseada que se midió en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-160A, utilizando alícuotas de 1 ml, empleando cubetas de plástico desechables. Alcanzadas las densidades ópticas deseadas se tomaron alícuotas de 1,5 ml para el análisis de extractos crudos (muestras denominadas no inducidas), donde las células fueron recolectadas mediante centrifugación a máxima velocidad en microfuga, y resuspendidas en tampón de muestra de proteínas 2 veces concentrado (ver apartado 3.2.15.4).

Al resto de los cultivos se les añadió el agente inductor IPTG, a distintas concentraciones en cada experimento (desde 0,1 a 1 mM), y a temperaturas y tiempos variables. Al final de la inducción, se tomaron siempre alícuotas de 1 ml para el posterior análisis de extractos crudos de proteínas totales (muestras inducidas), que fueron preparadas del mismo modo descrito para las muestras no inducidas.

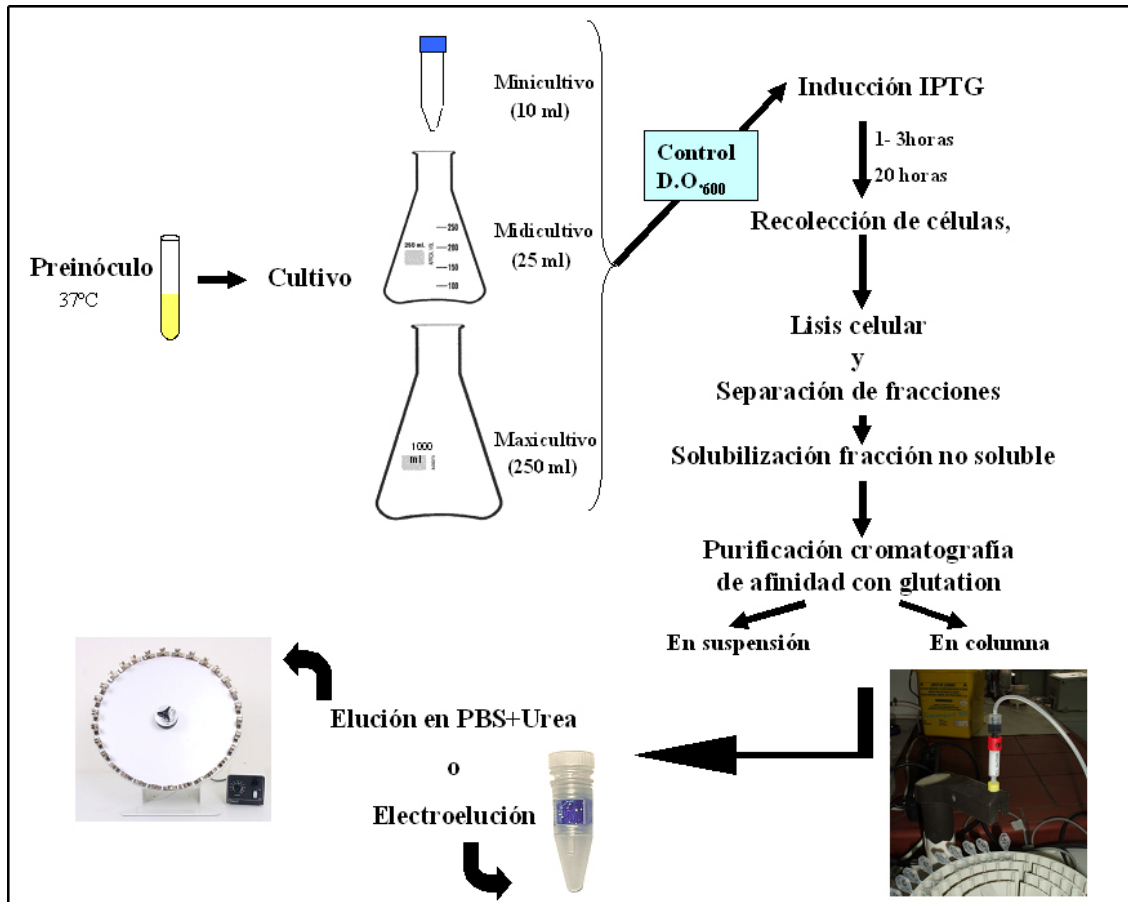


Figura 3.3. Esquema de pasos seguidos en la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*.

b) Lisis de los cultivos bacterianos

Finalizado el tiempo de inducción, los cultivos fueron sometidos a centrifugación para recolectar las células. Los minicultivos fueron centrifugados a 800 xg en microfuga durante 10 minutos, y los midi y maxicultivos fueron sometidos a centrifugación en frío a 4200 x g durante 10 minutos.

Se emplearon dos técnicas de lisis:

- ✓ Lisis mediante el sistema comercial B-PER (B-PER *Bacterial Protein Extraction Reagent*, Pierce): este sistema ha sido desarrollado para la extracción de proteínas recombinantes solubles de bacterias (*E. coli*). Contiene un detergente no iónico suave en fosfato sódico 50 mM (pH 7,5). Para la lisis celular y separación de fracciones soluble e insoluble, se siguieron las recomendaciones del fabricante.
- ✓ Lisis mediante sonicación: los sedimentos bacterianos fueron resuspendidos en los tampones de sonicación adecuados en cada caso (ver Tabla 3.9). Las muestras fueron sometidas a sonicación (sonicador Branson, Sonic Power

Company) de 3-4 pulsos (70 vatios) de 10 segundos cada uno (minicultivos) u 8-10 pulsos de 10 segundos (midi y maxicultivos), en frío. Los lisados fueron sometidos a centrifugación a 16000 xg durante 5 minutos para separar las fases. El sobrenadante (fracción soluble) fue transferido a un tubo nuevo y el sedimento (fracción no soluble) fue resuspendido en el mismo volumen de PBS o procesado.

Tampón	Componente	Concentración
Tampón de sonicación A	PBS	1X
Tampón de sonicación B	PBS DTT EDTA Lisozima (Merck)	1X 10 mM 1 mM 1mg/ml
Tampón de sonicación L (Chen <i>et al.</i> , 2001)	Tris-HCl pH8 NaCl DTT EDTA	50 mM 0,2 M 1 mM 1 mM
Tampón de sonicación C	Tampón de sonicación L Lisozima	- 1 mg/ml

Tabla 3.9. Tampones empleados en la lisis mediante sonicación de cultivos bacterianos inducidos.

c) Procesamiento de la fracción no soluble

El sedimento obtenido tras la centrifugación para separar las fases, fue resuspendido en un volumen del tampón adecuado para su solubilización. Los tampones empleados se indican en la Tabla 3.10. La solubilización se desarrolló durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

Tampón	Componente	Concentración
Tampón de solubilización A	PBS Tween 20 SDS	1X 2% 0,03%
Tampón de solubilización B	Tampón de solubilización A DTT	- 10 mM
Tampón de solubilización C	Tampón de solubilización B Urea	50 mM 3,5 M
Tampón de solubilización D	Tris HCl; pH 8 DTT SDS Tween 20 MgCl ₂ ATP	50 mM 10 mM 0,03% 2% 5 mM 2 mM
Tampón de solubilización E	Tris HCl; pH 8 DTT MgCl ₂ ATP	50 mM 10 mM 5 mM 2 mM

Tabla 3.10. Tampones empleados para la solubilización de las proteínas contenidas en la fracción no soluble de los cultivos inducidos.

d) Purificación de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad

d.1) Cromatografía de afinidad en suspensión: se llevó a cabo la purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad en suspensión, basada en la unión de proteínas a una sefarosa que presenta glutation acoplado, y posterior elución de las mismas empleando un tampón que contendrá glutation reducido. Como resina se empleó glutation-sefarosa 4B (Amersham Biosciences) capaz de unir más de 8 mg de proteína por ml de cultivo.

Las muestras fueron sometidas a unión con la resina en tubos eppendorf de 1,5 ml, añadiéndose 20 a 40 µl de sefarosa 50%. Dicha unión se desarrolló tanto a temperatura ambiente durante 1 a 3 horas, como a +4°C durante toda la noche. Tras este periodo de tiempo, los tubos fueron centrifugados a 500 xg durante 5 minutos, y los sobrenadantes fueron guardados a -20°C para su posterior análisis (muestra no unida). A continuación se realizaron 3 lavados del sedimento con 10 volúmenes de PBS por cada µl de sefarosa, en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras cada lavado, los tubos se centrifugaron a 500 xg (5 minutos), y se eliminaron los sobrenadantes. Finalmente, la elución de la proteína recombinante, realizó con un tampón de elución (Tabla 3.11). Las eluciones se desarrollaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recogieron por centrifugación a 500 xg (5 minutos).

Finalmente, con objeto de aumentar la pureza de la proteína recombinante, y eliminar proteínas contaminantes, las eluciones fueron sometidas a purificación mediante electroelución según se describe en el apartado e.

d.2) Cromatografía de afinidad en columna: se emplearon las columnas GSTrap FF (Amersham Biosciences) que contenían 1ml de sefarosa *Fast Flow* con alta capacidad de unión y fácil drenaje, y con glutathione inmovilizado. Las columnas se acoplaron a una bomba peristáltica y un colector de fracciones (Econo Pump, BioRad). Los pasos llevados a cabo en la purificación fueron:

- I. *Equilibrado de la columna*
- II. *Paso de la muestra por la columna:* La fracción no soluble solubilizada se aplicó a la columna en las condiciones que se recogen en la Tabla 3.11. La fracción no unida fue recogida para su posterior análisis mediante SDS-PAGE.
- III. *Lavados de la columna:* alícuotas de los lavados se analizaron mediante SDS-PAGE.
- IV. *Elución de la muestra:* se recogieron, en cada caso, de 10 a 12 fracciones de 1 a 0,5 ml.

Los parámetros y tampones desarrollados para la purificación se indican en la Tabla 3.11.

Una vez más, para aumentar la pureza de la proteína recombinante, las fracciones del eluato fueron sometidas a purificación mediante electroelución en PBS y elución en PBS/urea según se describe en el apartado e.

Paso	Flujo (ml/min)	Tampones	Composición	Volumen aplicado (ml)
Equilibrado de la columna	1	Tampón L	Tabla 3.9	5
		Tampón U	PBS 1X DTT 1 mM EDTA 1 mM	5
Unión de la muestra	0,2	-	-	5-8
Lavados	1	Tampón U	PBS 1X DTT 1 mM EDTA 1 mM	6- 8
		Tampón U II	Tampón U Urea 3 M	8
		Tampón L	Tabla 2.9	5
		Tampón L II	Tampón L Urea 2,3 M	8
Eluciones	0,5 -1	Tampón de Elución	Tris -HCl 50 mM pH8 Glutation reducido (Sigma) 10-15 mM	5-10

Tabla 3.11. Relación de etapas desarrolladas durante la purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad en columna. Se reflejan los flujos, tampones y volúmenes ensayados en cada paso.

e) Purificación mediante elución y electroelución

Las muestras objeto de purificación (eluciones de la cromatografía de afinidad o fase no soluble de cultivos inducidos) fueron separadas en geles de poliacrilamida en sistema SDS-PAGE, y se tiñeron con una solución de KCl 250 mM previamente enfriada a -20°C. La solución tiñe de color blanco las zonas del gel con mayor cantidad de proteína. Las bandas de interés, identificadas por su tamaño esperado, fueron escindidas del resto del gel mediante el uso de un bisturí y a continuación fueron sometidas a purificación mediante elución o electroelución.

e.1) ELUCIÓN PBS/Urea 3,5 M: las bandas de proteína embebidas en acrilamida fueron troceadas en pequeños fragmentos, con el uso del bisturí, e introducidas en un tubo eppendorf que contenía PBS con urea 3,5 M. Generalmente se utilizaron 100 µl de PBS por cada 0,5 cm² de gel de acrilamida. La muestra fue sometida a elución durante toda la noche, en agitación, a una temperatura de +4°C. Transcurrido este tiempo, los tubos fueron sometidos a centrifugación a 16000 xg, y los sobrenadantes, que contendrían la proteína de fusión, fueron recogidos y almacenados a -20°C hasta su utilización.

e.2) **ELECTROELUCIÓN EN PBS:** en este caso se utilizaron los dispositivos GeBAflex Maxi o Midi (Geba) diseñados para diálisis y extracción de proteínas de cualquier soporte. Las bandas de poliacrilamida escindidas, fueron colocadas en una de las ventanas del dispositivo, añadiéndose de 60 a 100 μ l de PBS 1X, por cada 0,5 cm^2 de gel de acrilamida. La electroelución se realizó en una cubeta de electroforesis horizontal, sumergiendo el tubo GeBAflex en tampón de electroforesis de proteínas 1X (apartado 3.2.15.4) y sometiéndolo a 100V durante 150-180 minutos, en función del tamaño de la proteína. A continuación, el contenido de los tubos fue transferido a un tubo limpio y almacenado a -20°C hasta su uso.

3.2.14.2 Ensayos de expresión en *Pichia pastoris*

A continuación se detallan los pasos realizados para la inducción de la expresión de proteínas en la levadura, así como los distintos protocolos de lisis y solubilización empleados. En la figura 3.4 se presenta un esquema de los pasos llevados a cabo.

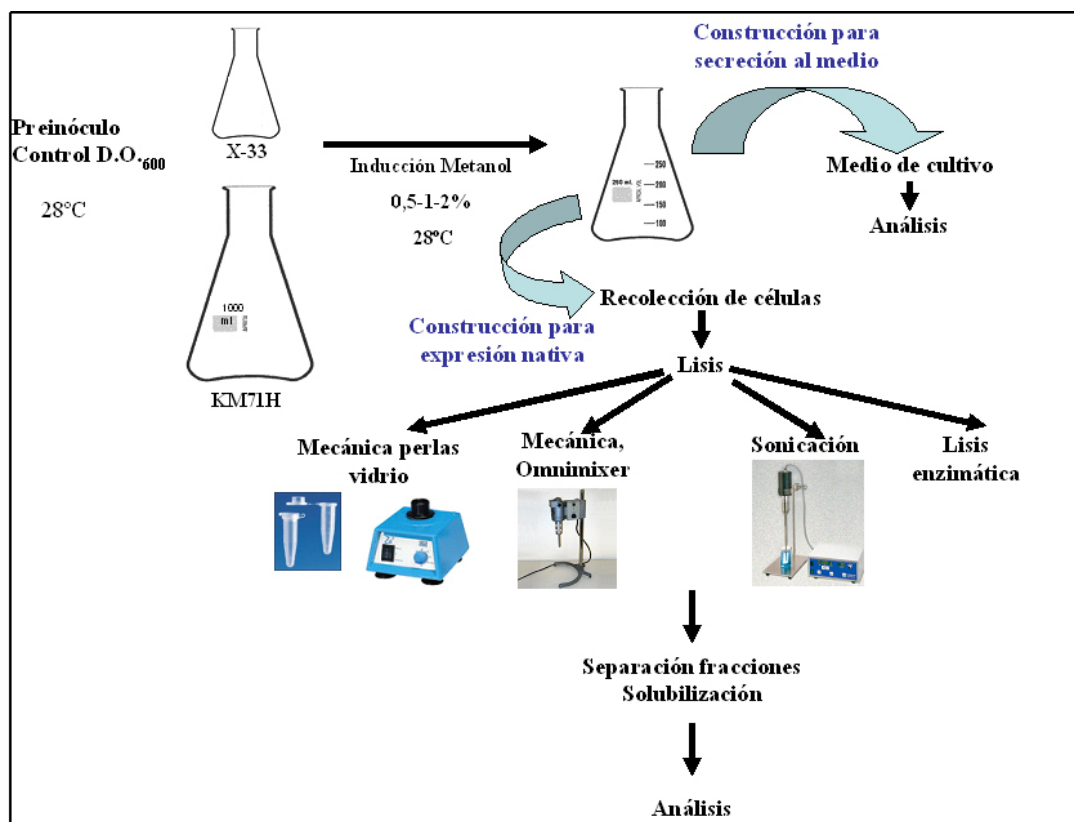


Figura 3.4. Esquema de pasos seguidos en la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*.

a) Inducción de los cultivos para expresión de proteínas heterólogas

a.1) Inducciones a pequeña escala

Para el crecimiento de los clones recombinantes, con objeto de obtener una cantidad de biomasa adecuada para proceder a la posterior inducción de la expresión de la proteína recombinante, se emplearon los medios BMGY (medio complejo tamponado con glicerol como fuente de carbono) y MGY (medio mínimo no tamponado, con glicerol como fuente de carbono) (Tabla 3.2). Los cultivos se incubaron a 28°C en agitación (150-170 rpm) durante 18-20 horas, en erlenmeyer comunes o con hendiduras (*buffled flasks*), hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 2 a 6. Los volúmenes de cultivo utilizados correspondieron a 1/10 del volumen nominal de los erlenmeyer empleados en cada caso, con objeto de mantener una adecuada aireación. A continuación, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 1500-3000 xg durante 5-15 minutos, a temperatura ambiente.

La inducción se realizó en medios BMMY (medio complejo, tamponado, con metanol como fuente de carbono) cuando el crecimiento se había realizado en medio BMGY, y en medio MM (medio mínimo no tamponado con metanol como fuente de carbono) cuando el crecimiento se había realizado en medio MGY (Tabla 3.2).

En el caso de los ensayos de expresión realizados con clones recombinantes de la cepa X-33, los sedimentos celulares recogidos tras la fase de crecimiento, fueron resuspendidos en un volumen del medio adecuado, para alcanzar una D.O.₆₀₀ de 1. Para los ensayos realizados con clones recombinantes de la cepa KM71H, las células fueron resuspendidas en un volumen del medio adecuado 10 veces inferior al volumen inicial de la fase de crecimiento.

La inducción del promotor se mantuvo añadiendo metanol 100% cada 24 horas, a concentraciones finales de 0,5; 1 y 2%, manteniéndose los cultivos durante 90 horas. Cada 12-24 horas, se tomaron alícuotas de distintos volúmenes, para analizar extractos crudos celulares y/o proteínas secretadas al medio. En ambos casos, las alícuotas se centrifugaron a máxima velocidad en microfuga. Para el análisis en SDS-PAGE/WB de proteínas secretadas al medio se tomaron 20 µl del sobrenadante y para el análisis de proteínas intracelulares se procedió al lisado de los sedimentos celulares (punto b).

a.2) Inducciones en fermentador de 50 l

Para llevar a cabo la inducción en un fermentador piloto de 30 L de volumen de trabajo (*Bioengineering AG*), primero se obtuvo un preinóculo sembrando 75 ml de medio BMGY con el clon recombinante, incubándolo a 30°C, con agitación (250 rpm) durante 48 horas. 50 ml del preinóculo se emplearon para inocular 750 ml del mismo medio. El inóculo se incubó a 30°C con agitación a 250 rpm durante 3 días. Todo el volumen se utilizó para inocular el fermentador que inicialmente contenía 14,25 L de medio BMGY. El proceso se desarrolló con parámetros constantes a temperatura de 30°C, pH de 5 (mediante la adición de NaOH al 25%) y flujo de aire 1800 L/h, y la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo siempre por encima del 50% con una agitación de 300 a 1000 rpm. La presión se mantuvo a 100 mbar, pudiendo aumentarse hasta 500 mbar cuando fue necesario para mantener la presión parcial de oxígeno.

El crecimiento inicial se desarrolló en modo discontinuo (*batch*) y la adición de glicerol se inició cuando la concentración celular fue tal que se necesitó una agitación de 400 rpm para mantener la concentración de oxígeno disuelto al 50%. La adición de glicerol se realizó en modo discontinuo alimentado (*fed-batch*) con un perfil exponencial que se mantuvo durante 10 horas. La tasa de adición de glicerol en cada instante vino dado por la fórmula $Q=Q_0e^{\mu t}$ (donde Q = tasa de adición de glicerol g/h, t = tiempo en horas, μ = tasa específica de crecimiento $0,16\text{ h}^{-1}$).

Finalizada la fase de adición de glicerol, la fase de alimentación con metanol (inducción) se desarrolló durante 70 horas, empleando los siguientes flujos: 4 horas: 43 g/h; 4 horas: 86 g/h y 62 horas: 129 g/h.

b) Procesamiento de cultivos inducidos

En el caso de la construcción 18L1Z α , dado que la proteína se encuentra fusionada con la señal de secreción en su extremo N-terminal, se analizaron mediante SDS-PAGE, los sobrenadantes de los cultivos inducidos (medio en el que se indujeron las levaduras). Las células inducidas se trataron según se indica a continuación.

b.1) *Lisis de las células inducidas*

Se ensayaron diferentes métodos de lisis, empleando los tampones recogidos en la tabla 3.12. En todos los casos tras la ruptura, los lisados celulares se clarificaron mediante centrifugación a 1000 xg durante 10 minutos a 4°C.

- ✖ Lisis mecánica con perlas de vidrio en vortex: se emplearon perlas de vidrio de 0,5mm de diámetro empleando el tampón de ruptura I o tampón de ruptura II suplementado con DTT 10 mM y glicerol al 5%.
- ✖ Lisis mecánica en homogeneizador: los sedimentos celulares se resuspendieron en un volumen de Tampón de ruptura II igual al volumen original de cultivo, y se sometieron a ruptura en homogeneizador (Omnimixer, Sorvall) durante 4 minutos a 0°C.
- ✖ Lisis por sonicación: los sedimentos celulares se resuspendieron en 0,5 a 1ml de Tampón de ruptura I por ml de cultivo inducido original y se sometieron a sonicación, mediante 14 pulsos de 10 segundos en frío, a una potencia de 70 vatios.
- ✖ Lisis enzimática
 - *Lisis enzimática con Glucanex y Zimoliasa*: los sedimentos celulares, correspondientes a 5 ml de cultivo inducido original, fueron resuspendidos en 1 ml de Tampón de ruptura III, al que se añadieron zimoliasa y glucanex (Sigma) a concentraciones finales de 60 µg/ml y 80 µg/ml respectivamente, incubándose 1 hora a 37°C.
 - *Lisis enzimática con Liticasa*:
 - a) los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de tampón de ruptura IV por cada ml de cultivo inducido original. Se añadió β-mercaptoetanol (Bio-Rad) al 0,001% y liticasa (Sigma) a concentración final de 500 U/ml. La digestión se desarrolló a 30°C durante 2 horas.
 - b) los sedimentos se resuspendieron en tampón de ruptura IV suplementado con DTT 10 mM, para alcanzar una concentración final de 330 mg/ml de cultivo. A la suspensión se añadió liticasa (Sigma) a concentración final de 500 U/ml. La mezcla resultante se incubó a 30°C durante 2 horas, para generar esferoplastos. Éstos fueron lisados mediante ruptura mecánica con perlas de vidrio del mismo modo que el descrito anteriormente.

<i>Tampón</i>	<i>Componentes</i>	<i>Aplicación</i>
Tampón de ruptura I pH 7,4	Fosfato potásico 50 mM	Lisis mecánica con perlas de vidrio
	EDTA 1mM	
	Glicerol 5%	Lisis mediante sonicación
Tampón de ruptura II (TEN) pH7,4	Tris HCl 50 mM	Lisis mecánica con perlas de vidrio
	EDTA 1 mM	
	NaCl 150 mM	Lisis mecánica en Homogeneizador
Tampón de ruptura III	Sorbitol 0,9 M	Lisis enzimática
	EDTA 0,1 M	
Tampón de ruptura IV (SCE) pH 7,5	Sorbitol 1M	Lisis enzimática
	Citrato sódico 10 mM	
	EDTA 10 mM	

Tabla 3.12. Relación de tampones de lisis empleados sobre los cultivos de levaduras inducidos.

c) Ensayos de solubilización de las fracciones insolubles

Para llevar a cabo la solubilización de los sedimentos (fracción no soluble) tras la clarificación de los lisados celulares obtenidos, éstos fueron resuspendidos e incubados en diferentes tampones:

- UREA 4-5M en PBS y solubilización durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación las muestras fueron o no dializadas frente a PBS.
- Tampón de solubilización PTSD (PBS+Tween 20 al 2%+SDS al 0,03%+DTT 10 mM) incubando 1 hora a temperatura ambiente.
- Tampón de solubilización PSBM (PBS+SDS al 0,5%+β-mercaptoetanol al 1%), incubando a 100°C durante 10 minutos.

3.2.14.3 Ensayos de expresión en células de insecto

En el presente apartado se detallan los protocolos utilizados para la expresión de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto, así como para la purificación de VLPs de la misma, que se resumen esquemáticamente en la Figura 3.5.

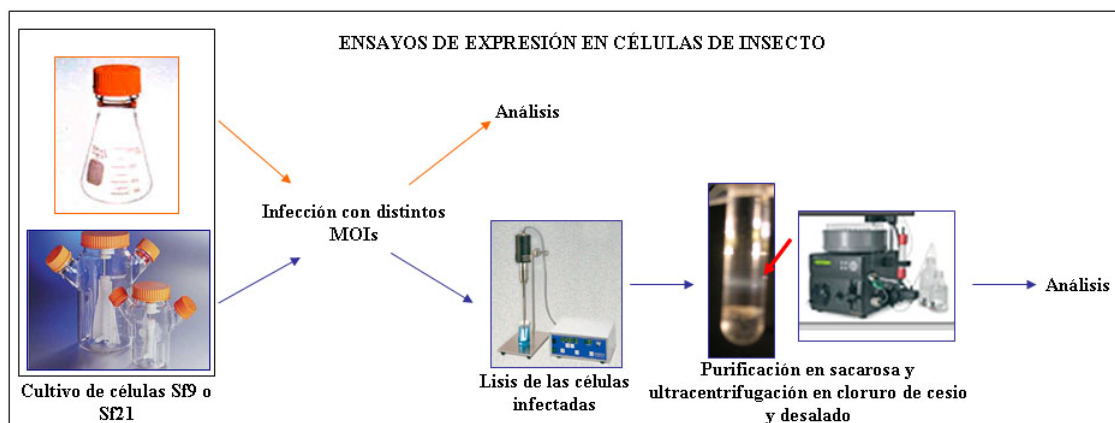


Figura 3.5. Esquema de pasos seguidos para los ensayos de cinética de expresión de la proteína L1 de VPH18 y la purificación de VLPs en células de insecto. En naranja se señalan los pasos para ensayos de cinética y en azul los pasos para purificación de VLPs.

a) Infección de células de insecto para expresión de proteínas heterólogas

Para llevar a cabo estos ensayos se trabajó con cultivos de 50 ml de células Sf9 y Sf21, en medio Sf900-II (Tabla 3.3) en erlenmeyer de 500 ml o con cultivos de 250 ml en fermentadores de 500 ml (volumen nominal), crecidos hasta una densidad de 1×10^6 células por mililitro, según se ha indicado en el apartado 3.2.1.3.

Alcanzada dicha densidad celular, se realizó la infección de los cultivos añadiéndose o no (en función del experimento), SFB inactivado por calor a una concentración final del 10%. Todas las infecciones se desarrollaron a 27°C con agitación de 90 rpm (erlenmeyer) o de 150 rpm (fermentadores) durante un tiempo variable, siendo el máximo de 7 días.

La viabilidad y la densidad celular se determinaron cada 6, 12 y/o 24 horas. Para ello se tomaron alícuotas de los cultivos infectados que se diluyeron en PBS, realizándose los recuentos celulares en cada caso, empleando un hemocitómetro de 0,2 mm de profundidad. Las alícuotas diluidas se mezclaron con una solución de azul tripán (Gibco) en PBS, que teñirá las células no viables. Además, se tomaron alícuotas de 1,5 ml que fueron posteriormente analizadas mediante WB (apartado 3.2.15.5) para determinar los niveles de expresión de la proteína en cada momento.

b) Lisis de células infectadas

Las células correspondientes a 750 ml de cultivos infectados en fermentadores, se recolectaron mediante centrifugación a 2000 xg durante 10 minutos, a +4°C, en una centrífuga Beckman J2-21 M/E (Beckman Coulter) utilizando un rotor JA-14. Los

sedimentos celulares fueron resuspendidos en 1 ml de tampón de lisis (Tabla 3.13) de células de insecto, por cada 2×10^7 células, suplementado con los siguientes inhibidores de proteínas: Leupeptina (Roche) 10 $\mu\text{g/ml}$, Aprotinina (Sigma) 10 $\mu\text{g/ml}$, PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma) y Pepstatina A 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma).

<i>Componente</i>	<i>Concentración</i>
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	130 mM
Tritón X-100	1%
NaF	10 mM
NaPi	10 mM
NaPPi	10 mM

Tabla 3.13. Composición del tampón de lisis de células de insecto.

La lisis se desarrolló durante 45 minutos en hielo, y a continuación se llevó a cabo la sonicación en frío de las células utilizando un sonicador de micropipeta (*Fisher Scientific*). La suspensión celular se sometió a 5-7 ciclos de lisis de 20 segundos cada uno, a una potencia de 50-60%. El lisado fue centrifugado a 3000 xg durante 15 minutos, a +4°C. El sobrenadante fue recogido y se repitió una vez más la centrifugación.

c) Purificación en sacarosa y ultracentrifugación en CsCl

El sobrenadante se clarificó mediante centrifugación a 8000 xg, durante 30 minutos (+4°C), utilizando tubos de policarbonato. El sedimento se resuspendió en 20 ml de una suspensión de sacarosa al 67% en agua, suplementada con CaCl_2 (3,3 mM). Para la completa resuspensión de los sedimentos se utilizaron jeringas acopladas con agujas, y la muestra se pasó varias veces por las mismas, hasta que la suspensión fue casi homogénea.

Dicha suspensión se sometió a centrifugación a 37600 xg durante 1 hora, a +4°C, en rotor JA-20. Finalizada la centrifugación, los sedimentos se resuspendieron en 8 ml de PBS suplementado con MgCl_2 1 mM y CaCl_2 1 mM. En este paso también fue necesario realizar una resuspensión completa, por lo que una vez más se emplearon jeringas acopladas con agujas. Finalmente se añadió CsCl al 27% y la mezcla se homogeneizó mediante el uso de vortex. La suspensión fue utilizada para rellenar tubos perforables para el rotor Sw60ti (Beckman), donde se realizó la ultracentrifugación a 207976 xg durante 48 horas a +4°C.

Tras la centrifugación se recogieron, mediante punción con aguja y extracción con jeringa, todas las bandas obtenidas en el gradiente, que se encontraban localizadas de 1,3 a 1,7 cm del fondo del tubo. Además se midió el índice de refracción de las bandas recogidas, empleando un refractómetro.

d) Eliminación del CsCl (desalado)

La eliminación del CsCl se llevó a cabo utilizando columnas de desalado de 5 ml pre-empaquetadas con medio *Sephadex* G-25 superfino (GE Healthcare). La columna se acopló con un sistema de cromatografía de aire líquido ÄKTA Explorer 100 (GE Healthcare), equipado con un lector de UV a tres longitudes de onda simultáneas y monitores de conductividad y pH.

La columna se equilibró con DPBS (PBS suplementado con CaCl_2 0,1 mM, MgCl_2 0,5 mM, KCl 2,67 mM, Invitrogen) o con PBS suplementado con MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM y NaCl 150 mM y las eluciones se llevaron a cabo a un flujo de 2 ml/min a temperatura ambiente en DPBS o PBS suplementado con MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM y NaCl 150 mM como tampones de elución.

La recogida y análisis de datos se llevó a cabo utilizando el programa UNICORN 5.0 (GE Healthcare).

3.2.15 Análisis y caracterización de proteínas

3.2.15.1 Diálisis de muestras de proteínas

Las diálisis para eliminar sales, urea, detergentes etc., fueron realizadas en casetes de diálisis de valor nominal de corte de 7KDa (Pierce), o en tubos GeBAflex (GeBa). Todas fueron realizadas frente a volúmenes del tampón adecuado en cada caso, de 200 a 1000 veces el volumen de muestra, realizándose además en 1 ó 2 cambios de tampón, siendo normalmente el último desarrollado durante toda la noche a +4°C.

3.2.15.2 Concentración de proteínas

La concentración muestras de proteínas se llevó a cabo empleando dos métodos:

a) Concentración mediante precipitación con Etanol: se añadieron 5 volúmenes de Etanol 100% frío (-20°C) a las muestras de proteínas en DPBS. La mezcla se incubó a -20°C durante 1-12 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a velocidad

máxima en microfuga, y tras el secado de los precipitados se resuspendieron a volumen final en DPBS, o PBS suplementado con MgCl_2 1 mM , CaCl_2 1 mM y NaCl 150 mM.

b) Concentración mediante el uso de unidades Microcon YM-10 (Millipore): se siguieron las recomendaciones del fabricante.

3. 2.15.3 Determinación de las concentraciones de proteína

a) Determinaciones mediante medidas espectrofotométricas

La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorbancia a 280 y 260 nm, utilizando la fórmula: $[\text{mg/ml}] = (1,55A_{280} - 0,76A_{260}) \times Fd$, siendo Fd = Factor de dilución, o la fórmula $1 \text{ U } A_{280} = 1 \text{ mg/ml}$ en el caso de las medidas realizadas en el aparato nanodrop.

Las medidas de A_{260} y A_{280} , se obtuvieron de la misma forma a la indicada en el apartado 3.2.8. Como blanco, se utilizó el diluyente en el que se encontraba la muestra a analizar en cada caso.

b) Determinación mediante el uso de ensayos colorimétricos

Se utilizó el sistema comercial *BCA Protein Assay Kit* (Pierce) basado en el método conocido como BCA. Este método combina la reducción de los cationes divalentes Cu^{2+} a cationes monovalentes Cu^{1+} , llevada a cabo por las proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret), con la reacción colorimétrica altamente sensible y selectiva que ocurre entre el catión cuproso Cu^{1+} y el ácido bicinonínico (BCA). La reacción de biuret no tiene lugar en presencia de aminoácidos individuales ni dipéptidos, sino sólo en presencia de tripéptidos o polipéptidos de mayor tamaño así como proteínas. En el segundo paso, el BCA reacciona con el catión cuproso formado en la reacción de biuret dando lugar a un complejo BCA/Cu^+ soluble en agua, que presenta una fuerte absorbancia a 562 nm que aumenta de forma lineal a medida que aumenta la concentración de proteína.

El ensayo se llevó a cabo en placas multipocillo (96 pocillos) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La absorbancia fue leída a 562 nm en un lector de microplacas (Molecular Probes). La curva patrón se generó con muestras de BSA de concentración conocida, proporcionadas por el fabricante.

3.2.15.4 Electroforesis desnaturalizante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para la separación y el análisis de proteínas totales y purificadas, se empleó la técnica de separación electroforética de proteínas descrita por Laemmli (1970).

a) Acrilamida y tampones de electroforesis

La separación de proteínas se llevó a cabo en geles de acrilamida:bisacrilamida (30:1, Amresco) discontinuos. El gel de entrada se realizó siempre a una concentración del 4%, en tanto que el gel separador se preparó a diferentes concentraciones en función de las proteínas a separar (7,5%, 10%, 12%). También se utilizó la mezcla de acrilamida:biscrilamida (37,5:1) comercial Protogel (National Diagnostics). Como tampón de electroforesis se empleó una solución 1X compuesta por Tris Base 3 g/L; Glicina 14,4 g/L; SDS al 0,1% (p/V).

También se utilizaron geles de SDS-PAGE en gradiente preempaquetados (NuPAGE 4-12%, Invitrogen), empleándose tampón MES (Invitrogen) como tampón de electroforesis.

Se utilizaron diferentes marcadores de peso molecular preteñidos de distintas casas comerciales (BioRad, Fermentas, Invitrogen) y no teñidos (BioRad, GE-Healthcare).

b) Preparación de las muestras

Las muestras a analizar se diluyeron en tampón de muestra 6X, llevándolo a una concentración final 1X (Tabla 3.14) y se hirvieron durante 3 minutos. A continuación fueron transferidas a hielo y clarificadas mediante centrifugación a la máxima velocidad en microfuga, durante 3 minutos. En cada pocillo se cargaron aproximadamente 20 µl de muestra. Para los geles preparativos se emplearon 250 µl de muestra.

<i>Componentes</i>	<i>Concentración 1X</i>
Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
Glicerol	20% (v/v)
β-mercaptoetanol	5% (v/v)
SDS	2% (p/v)
Azul de bromofenol	2,5% p/v

Tabla 3.14. Composición del tampón de muestra para separación electroforética en geles de acrilamida.

En el caso de las muestras analizadas en geles pre-empaquetados, se diluyeron en el tampón de muestra LDS 4X (Invitrogen) a concentración final 1X, al que previamente se le añadió el agente reductor (Invitrogen) y se desnaturalizaron a 70°C durante 10 minutos.

c) Condiciones electroforéticas

Los geles se realizaron en cubetas de electroforesis de Bio-Rad (Miniprotean II), ATTO y OmniPAGE. La electroforesis se llevó a cabo a amperaje constante de 0,2 mA/cm² hasta superar el gel concentrante, y a un amperaje constante de aproximadamente 0,5 mA/cm² durante la separación de las proteínas en el gel inferior separador. En el caso de los geles de acrilamida pre-empaquetados, la separación se desarrolló a voltaje constante, 200V, durante aproximadamente 35 min.

d) Tinción de geles de poliacrilamida

Los geles se fijaron y tiñeron durante 30 minutos en una solución constituida por Azul Coomassie R-250 (BioRad) al 0,25% (p/v); metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v). Los geles fueron desteñidos en una solución de metanol al 25% y ácido acético al 7,5%, manteniéndose en agitación hasta que las bandas de las proteínas fueron claramente visibles.

Adicionalmente se empleó la solución de Azul Coomassie *SeeBand* (Geba), que no contiene ácido acético. Los geles fueron lavados en agua destilada durante 1 minuto, sometidos a calor en microondas a la máxima potencia. Este lavado se repitió durante dos veces más siendo necesario para eliminar el SDS de los geles. A continuación fueron teñidos durante 1 minuto en la solución de Coomassie comercial, también en microondas a la máxima potencia. Finalmente el desteñido se realizó en agua destilada, a temperatura ambiente, hasta que las bandas fueron claramente visibles.

3.2.15.5 Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las muestras separadas electroforéticamente en SDS-PAGE, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, utilizando dos métodos: transferencia húmeda y transferencia semiseca.

Cuando fue necesario, para cortar tiras de nitrocelulosa, correspondientes a las calles del gel de acrilamida, o para asegurar la integridad de las proteínas transferidas, las membranas se tiñeron temporalmente con Ponceau S al 0,1% (Fluka) en una

solución de ácido acético al 5%, destiñéndose posteriormente en agua hasta, la visualización de las bandas y después hasta su posterior desaparición.

a) Transferencia húmeda

Se utilizó un sistema de transferencia húmeda (BioRad), empleando como tampón de transferencia una solución constituida por: tampón de electroforesis 1X + metanol al 20% (v/v). Las membranas de transferencia empleadas fueron membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (BioRad) y membranas Hybond-C (Amersham Biosciences). La transferencia se realizó a temperatura ambiente durante una hora a amperaje constante (1,5 mA/cm²).

b) Transferencia semiseca

Se empleó un sistema de transferencia semiseca (Amersham) para la transferencia de los geles pre-empaquetados (Invitrogen). Como tampón se utilizó la siguiente mezcla: NuPAGE Transfer Buffer 20X (Invitrogen) 1X y Metanol al 10% (v/v). La transferencia se desarrolló a amperaje constante de 1 mA / cm² durante 1 hora y media.

3.2.15.6 *Western Blot*. Inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa

Las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo (Tabla 3.15). El bloqueo se desarrolló durante 1-2 horas a temperatura ambiente, o durante toda la noche a +4°C.

<i>Tampón</i>	<i>Composición</i>
TBS	Tris-HCl pH 7,4 20 mM
	NaCl 150 mM
TBST	TBS
	Tween 20 0,05% (v/v)
Soluciones de bloqueo	BSA (3%)+TBST+Tritón X-100 (0,1%)
	Leche desnatada (5%)+TBST+ Tritón X-100 (0,1%)
Tampón para dilución de anticuerpos	BSA (1%)+TBST+Tritón X-100 (0,1%)
	Leche desnatada (1%)+TBST+ Tritón X-100 (0,1%)

Tabla 3.15. Composición de los tampones y soluciones empleadas en WB.

A continuación, las membranas fueron lavadas en TBS durante 5-10 minutos y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios o anticuerpos directos (Tabla

3.16), diluidos en los tampones para dilución de anticuerpos reflejados en la tabla 3.15. La unión se desarrolló tanto 1-2 horas a temperatura ambiente como toda la noche a +4°C.

Anticuerpo	Dilución en WB
Sueros humanos	1:50 y 1:100
Sueros hiperinmunes de ratón	1:50 y 1:100
Cóctel de amplio espectro (IH8)	1:80 y 1:100
Anticuerpo monoclonal anti-VPH18 HPV-4C4	1:100 y 1: 200
Anti-myc ^{AP}	1:2000
Anti-GST ^{HRP}	1:5000

Tabla 3.16. Anticuerpos primarios conjugados y no conjugados empleados en las inmunodetecciones mediante WB. Se indica la dilución de trabajo empleada para cada uno de ellos.

Transcurrida la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron una serie de lavados para eliminar los anticuerpos no unidos y evitar así reacciones inespecíficas (dos lavados en TBST de 10 minutos y un lavado en TBS de 5 minutos). A continuación las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 3.17) diluidos en las mismas soluciones que los anticuerpos primarios (Tabla 3.15), durante 1-2 horas a temperatura ambiente.

Anticuerpo	Dilución de trabajo
Anti-IgG humana ^{HRP}	1:3000 y 1:5000
Anti-IgG humana ^{AP}	1:20000
Anti-IgG de ratón ^{HRP}	1:10000
Anti-IgG de ratón ^{AP}	1:10000
Anti-IgG de ratón ^{AP}	1:3000

Tabla 3.17. Anticuerpos secundarios empleados en WB.

Posteriormente, las membranas fueron lavadas igual que en el paso anterior para eliminar el exceso de anticuerpo conjugado.

Finalmente se llevó a cabo el revelado, con los sustratos correspondientes en función de la enzima con la que estuviera conjugado el anticuerpo (HRP o AP, ver Tabla 3.18). El revelado se desarrolló a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad, hasta que las bandas fueron claramente visibles, normalmente evitando un exceso de fondo. El revelado fue detenido con agua destilada en todos los casos.

<i>Enzima</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Concentración</i>	<i>Diluyente</i>
Peroxidasa	DAB (SIGMA) (2 µg/ml en metanol)	200 µg/µl	PBS
	Cloronaftol (SIGMA) (3 µg/ml en metanol)	300 µg/µl	
	H ₂ O ₂ (SIGMA) (30%)	0,006%	
Fosfatasa alcalina	NBT (SIGMA) (10 mg/ml en DMF 70%)	330 µg/ml	Tampón fosfatasa (Tris-HCl 100mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl ₂ 5 mM)
	BCIP (SIGMA) (5 mg/ml en DMF)	170 µg/ml	
	1 step NBT/BCIP (Pierce)	-	-

Tabla 3.18: Lista de sustratos utilizados para revelar las reacciones enzimáticas de anticuerpos conjugados. Se indican además, los diluyentes empleados en cada caso.

En los ensayos de cinética de expresión de proteínas, las bandas obtenidas tras el revelado de los WB, fueron analizadas densitométricamente, utilizando el *software Image Quant* (*Image Quant* version 5.0 Build 050, Molecular dynamics).

Los datos de intensidad de las bandas obtenidos, se normalizaron dividiendo todos los valores entre el menor de cada membrana. Posteriormente, estos datos fueron analizados utilizando el programa Microsoft Excel (Microsoft).

3.2.15.7 Eliminación de anticuerpos unidos a membranas

Para la eliminación de anticuerpos unidos a las membranas de nitrocelulosa de WB, se empleó una solución de eliminación de anticuerpos (GeBa). Las membranas se incubaron sumergidas en la solución durante 30 minutos, en agitación vigorosa. Finalmente se sometieron a 6 lavados con 300 ml de agua destilada cada uno. En este momento se consideraron listas para ser sometidas a incubación con nuevos anticuerpos.

3.2.15.8 ELISA

Para realizar los ensayos de ELISA se emplearon placas multipocillo Maxisorp y Polysorp de 96 pocillos de fondo plano (Nunc).

Los antígenos empleados en los ensayos se diluyeron a concentraciones deseadas en Tampón carbonato/bicarbonato (NaHCO₃ 1M; Na₂HCO₃ 1M; pH 9,6), sensibilizándose las placas con 100 µl de la dilución, durante 12-16 horas a +4°C.

A continuación las placas se lavaron cuatro veces con solución de lavado (PBST: PBS pH 7,4, suplementado con Tween 20 al 0,05%) y se incubaron con solución de bloqueo (BSA al 1 o al 3% en PBST), durante 1-2 horas a 37°C. Tras el bloqueo y los lavados, a cada pocillo se añadieron 100 µl del suero o anticuerpo correspondiente, preparado en BSA al 1% en PBST. Las placas con las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C y a continuación se lavaron, como en los casos anteriores, para eliminar los anticuerpos no unidos. Finalmente se añadieron los anticuerpos conjugados con HRP correspondientes (ver Tabla 3.16 y 3.17), preparados en solución de bloqueo a las diluciones indicadas por el fabricante incubándose 1 hora, a 37°C. Las placas se lavaron y se revelaron con 100 µl de solución de revelado: OPD (Sigma) 3 mg/ml, en tampón citrato-fosfato ($C_6H_5Na_3O_7$ 50 mM; Na_2HPO_4 100 mM; pH 5), suplementado con H_2O_2 al 0,03%; o bien empleando el sustrato comercial preparado (Sigma-Fast OPD, ortofenilendiamina). El revelado se detuvo añadiendo 50 µl de H_2SO_4 4 N en el primer caso o 50 µl de HCl 3M en el segundo. La lectura de las placas se realizó empleando un lector Denley Wellscan, a 492 nm.

El punto de corte se calculó como la media de las absorbancias de los sueros negativos más dos veces la desviación estándar.

3.2.15.9 Microscopía electrónica de transmisión

Un volumen variable de las muestras a analizar (3-10 µl), se depositó en rejillas Formvar cubiertas de cobre (400-mesh) con película de polivinilo (Aname), durante 1 minuto. La rejilla se sumergió en acetato de uranilo al 1% durante 30 segundos dejándose secar al aire a temperatura ambiente. El exceso de acetato se eliminó con papel de filtro, repitiéndose esta operación 2 veces más. Finalmente las muestras se dejaron secar al aire, a temperatura ambiente, sobre papel de filtro. Una vez secas, las preparaciones fueron observadas empleando un microscopio electrónico JEM 200 Ex (JEOL, Sollentuna, S).

3.2.15.10 Análisis por Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Mediante esta técnica se puede determinar el diámetro de diversas partículas, midiendo el movimiento browniano de las partículas presentes en la muestra, interpretando posteriormente el tamaño de éstas mediante teorías establecidas.

Para ser sometidas a este análisis, las muestras fueron diluidas a concentraciones de proteína total de 60 y/o 30 $\mu\text{g/ml}$ en tampón PBS suplementado con MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM y NaCl 150 mM y filtradas empleando filtros para jeringas de 0,2 ó 0,45 μm (Millipore).

Las medidas se realizaron empleando un aparato Zetasizer ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd.), que analiza cada muestra por triplicado. Las muestras se dispusieron en cubetas desechables, y se fijó como dispersante el tampón utilizado en la dilución de las mismas. La recogida y análisis de datos se llevó a cabo utilizando el *software Dispersion Technology Software 4.20* (Malvern Instruments Ltd.)

4 . RESULTADOS

4. RESULTADOS

En el presente apartado se detallan los resultados obtenidos a lo largo de los experimentos de clonación y expresión de las distintas construcciones de la proteína L1 de VPH18, en distintos sistemas de expresión procariotas (*E. coli*) y eucariotas, tanto en levaduras (*P. pastoris*), como en células de insecto (empleando baculovirus recombinantes).

En la figura 4.1 se muestran todas las construcciones generadas para su expresión en los distintos sistemas.

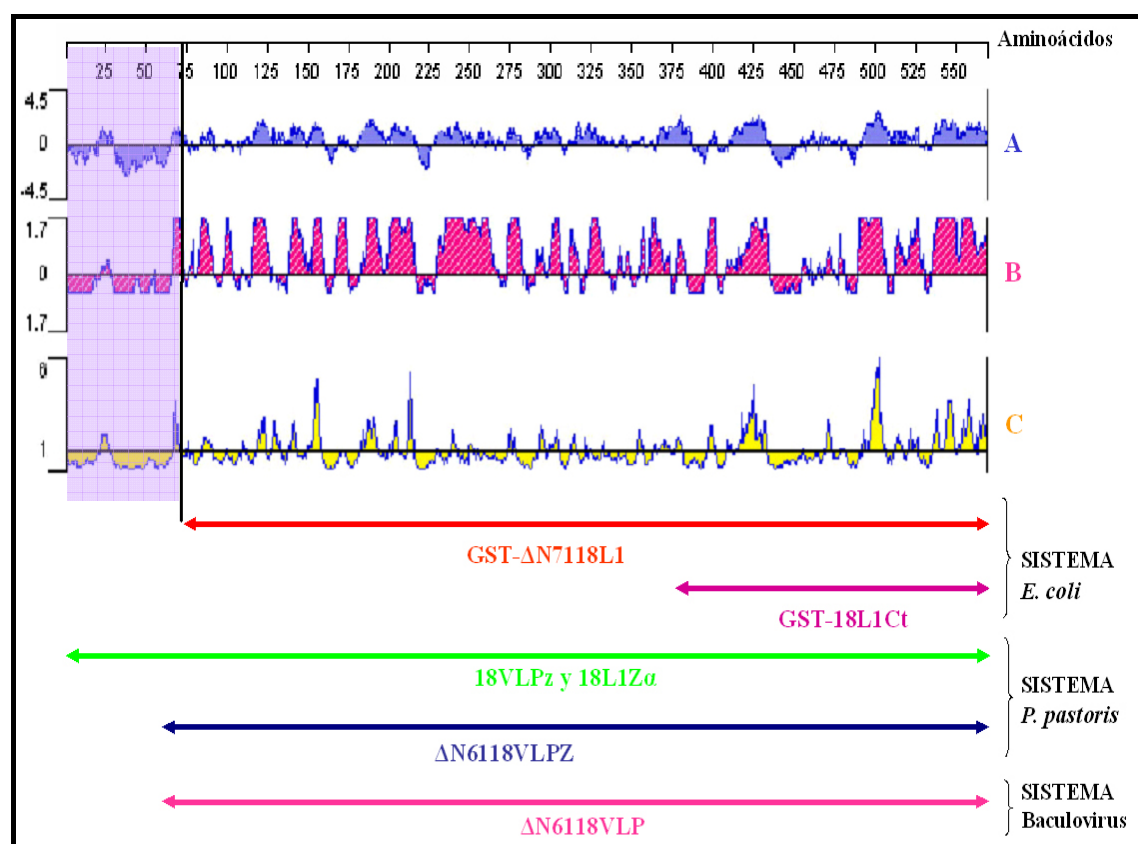


Figura 4.1. Perfiles deducidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína L1 de VPH18 obtenidos con el programa Protean (DNASTar). (A) Índice de hidrofobicidad de Kyte & Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982), (B) Índice antigénico de Jameson-Wolf (Jameson & Wolf, 1988) y (C) Probabilidad de localización en superficie de Emini (Emini *et al.*, 1985). En el recuadro morado se muestra la región N-terminal de carácter fuertemente hidrofóbico deletcionada en las construcciones utilizadas en bacterias y baculovirus.

A lo largo del trabajo, nos referiremos a las posiciones en pares de bases (pb) de la secuencia que codifica proteína L1 de VPH18 en relación al codón de inicio virtual proporcionado por las bases de datos, en la posición 5430 del genoma (posición 1 del alineamiento del gen mostrado en el Anexo 1). Corriente abajo de éste, en el mismo

marco de lectura, encontraremos otros dos ATG que corresponden a las posiciones 5535 y 5613 del genoma respectivamente (posición 106 y posición 184, ver Anexo 1). El ATG de la posición 5613 corresponde a la denominada metionina consenso que es común a VPHs de alto y bajo riesgo. Sólo los VPH de alto riesgo presentan otras metioninas alternativas a la consenso (Webb *et al.*, 2005).

4.1 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE L1 DE VPH18 EN *Escherichia coli*

Se realizó la expresión de proteínas recombinantes basadas en construcciones obtenidas a partir de la proteína L1 de VPH18, como proteínas de fusión con GST en su extremo N-terminal. Para ello se empleó el sistema basado en los vectores de expresión pGEX-4T. La fusión con la proteína GST se llevó a cabo para facilitar la posterior purificación de las proteínas recombinantes generadas, mediante cromatografía de afinidad con glutation.

En este sistema se generaron dos construcciones:

1. Construcción correspondiente a la región carboxi-terminal de la proteína L1 de VPH18, correspondiente a los aminoácidos 377 a 569, fusionada con GST en su extremo N-terminal. Se denominó **GST-18L1Ct**. La región carboxi-terminal de la proteína L1 tiene poco carácter hidrofóbico según el índice de hidrofobicidad de Kyte & Doolittle, y presenta mayores probabilidades de aparecer en superficie según el perfil de Emini, así como de poseer carácter antigénico según Jameson-Wolf, que la región N-terminal (ver Figura 4.1). En la proteína nativa, los residuos contenidos en esta construcción forman 5 α -hélices, tres de las cuales son responsables de la interacción con otros capsómeros, otra hélice actúa como ancla, y finalmente los últimos 31 residuos no presentan plegamiento y se proyectan hacia el interior de la partícula (Figura 1.6).
2. Construcción correspondiente a la región L1 deletada en 71 aminoácidos (10 aminoácidos desde la tercera metionina o metionina consenso), fusionada con GST en su extremo N-terminal. Se denominó **GST- Δ N7118L1**. El extremo N-terminal de la proteína L1 presenta un fuerte carácter hidrofóbico, una baja probabilidad de aparecer en la superficie de la proteína plegada y poco carácter antigénico (ver

Figura 4.1). Las proteínas con fuerte carácter hidrófobo tienen una gran tendencia a la formación de cuerpos de inclusión cuando son expresadas en sistemas bacterianos, que dificultan su posterior detección y purificación. Por estos motivos, se decidió delecionar la región N-terminal mencionada.

El esquema completo seguido para la obtención de las proteínas recombinantes se muestra en la figura 4.2. De forma resumida, los productos de amplificación obtenidos con oligonucleótidos seleccionados fueron clonados en el vector pCR-2.1 TOPO y, o bien subclonados en los vectores pGEX-4T (estrategia seguida para generar la construcción GST-18L1Ct), o bien recuperados del vector por un nuevo proceso de amplificación con oligonucleótidos internos conteniendo dos dianas de restricción para realizar una clonación dirigida en el vector pGEX-4T (construcción GST- Δ N7118L1). El proceso se detallará a continuación.

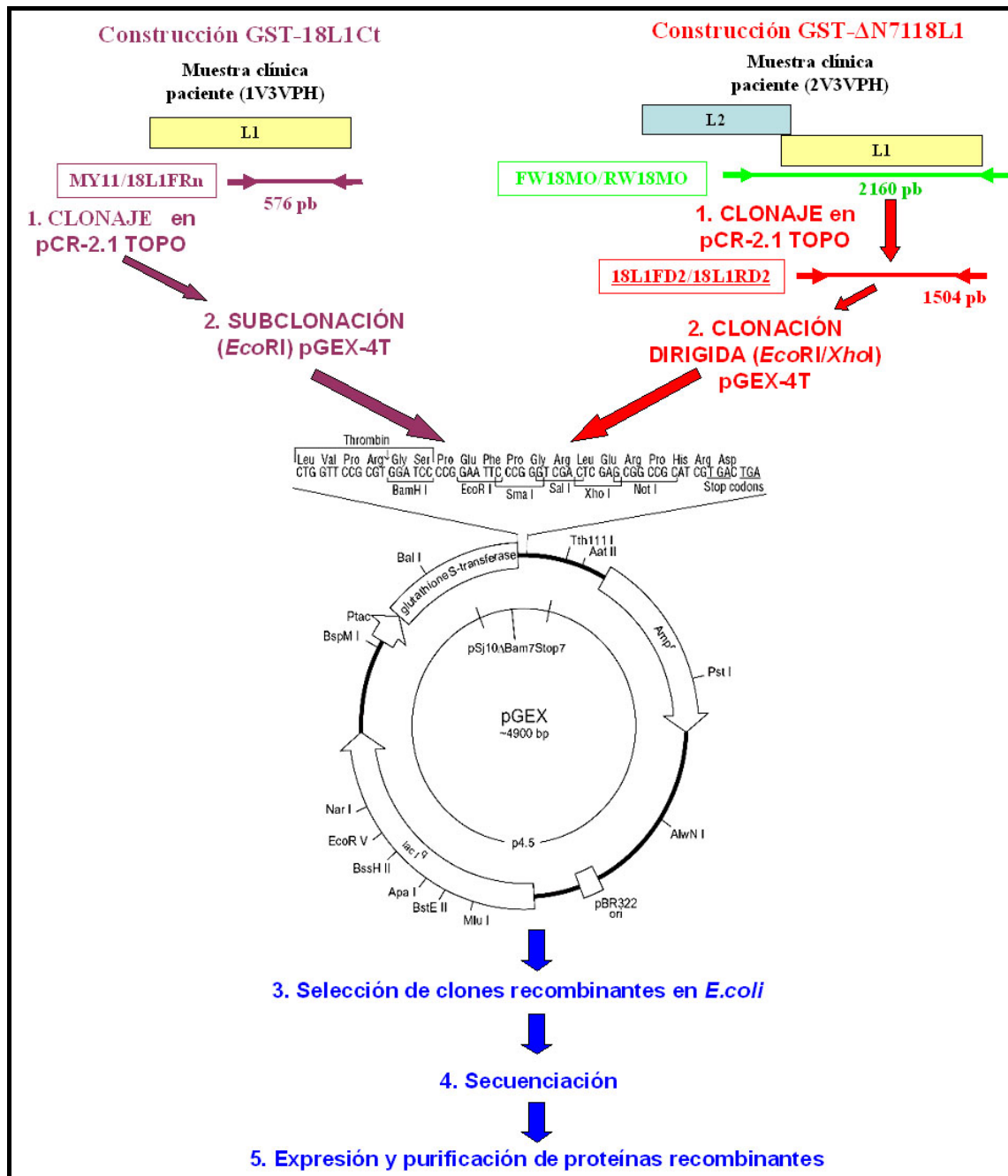


Figura 4.2. Esquema de pasos seguidos para la obtención de clones recombinantes para las construcciones realizadas en *E. coli*.

4.1.1 Amplificación de la región L1 de VPH18

Para la amplificación de la región L1 de VPH18, se diseñaron varias parejas de oligonucleótidos (Tabla 3.4), localizados en distintas regiones, tanto internos como externos a la secuencia que codifica la proteína L1 (Figura 4.3). Sólo con las parejas que aparecen enmarcadas en la figura, se obtuvo amplificación.

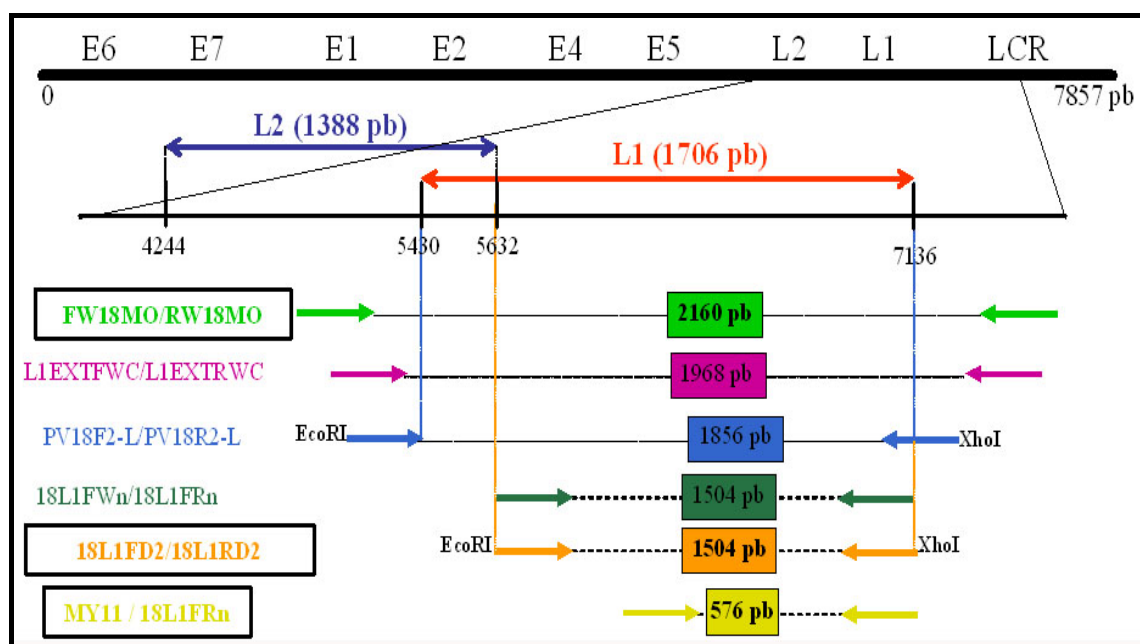


Figura 4.3. Esquema de todos los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la región L1 de VPH18, para su expresión en sistemas procariotas. Recuadradas se muestran las parejas con las que se obtuvo amplificación.

a) Construcción GST-18L1Ct

La amplificación de la región carboxi-terminal para la construcción GST-18L1Ct se obtuvo por PCR con la pareja de oligonucleótidos MY11/18L1FRn. Como molde se emplearon extracciones de ADN de células HeLa (controles de amplificación), así como extracciones de ADN de células de cérvix de una paciente caracterizada genéticamente como infectada (1V3VPH) con VPH18. Las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 3.5. Se obtuvo así la amplificación de un fragmento de 576 pb (Figura 4.4, A). Se continuó trabajando con el producto de amplificación procedente de la muestra clínica, que se clonó en el vector pCR2.1-TOPO para facilitar su posterior subclonación (*EcoRI*) en los vectores de expresión. Los clones recombinantes se identificaron mediante análisis de los plásmidos digeridos con *EcoRI* en agarosa (Figura 4.4, B).

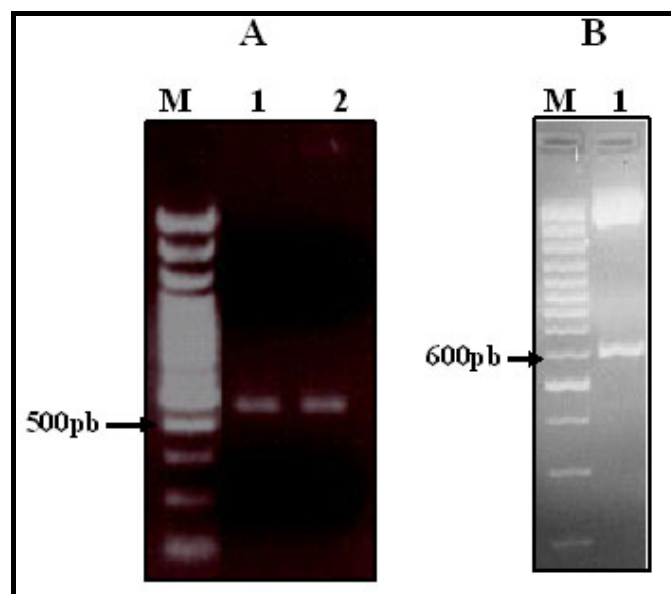


Figura 4.4. Análisis en agarosa al 2,5% de (A) productos de amplificación obtenidos con los cebadores MY11/18L1FRn para amplificación de la región carboxi-terminal. Calle 1: amplificación sobre extracciones de ADN de muestras clínicas. Calle 2: amplificación sobre extracciones de ADN de células H1HeLa (B) Calle 1: plásmido digerido con *EcoRI* aislado de un clon recombinante obtenido tras la clonación de este producto de amplificación en el vector pCR2.1-TOPO. M: marcador de tamaño molecular.

b) Construcción GST-ΔN7118L1

Inicialmente se emplearon las parejas de cebadores L1EXTFWC/L1EXTRWC y PV18F2-L/PV18R2-L. No se obtuvo amplificación con ninguno de ellos ni a partir de muestras clínicas ni a partir de ADN de la línea celular HeLa, por lo que se diseñaron unos oligonucleótidos más externos a la región L1 (FW18MO/RW18MO) (Figura 4.3). En esta reacción de amplificación se emplearon como ADN molde, extracciones de ADN de células HeLa (control de amplificación), y de células cervicales de una paciente infectada con VPH18 (muestra 2V3VPH), si bien se prosiguió con la amplificación obtenida a partir de la muestra clínica. Las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 3.5. Se consiguió así un producto de PCR de 2160 pb (Figura 4.5, A) que fue clonado en el vector pCR-2.1 TOPO. El ADN plasmídico de los clones recombinantes de *E. coli* seleccionados tras el clonaje, fue aislado y digerido con *EcoRI* (Figura 4.5, B). Los plásmidos recombinantes fueron empleados como molde para una reacción de PCR con la pareja 18L1FD2/18L1RD2, basados en oligonucleótidos diseñados previamente por Sehr y colaboradores (Sehr *et al.*, 2002). Los ciclos de amplificación se muestran en la Tabla 3.5. Tras la reacción se obtuvo un fragmento de 1504 pb (Figura 4.5, C).

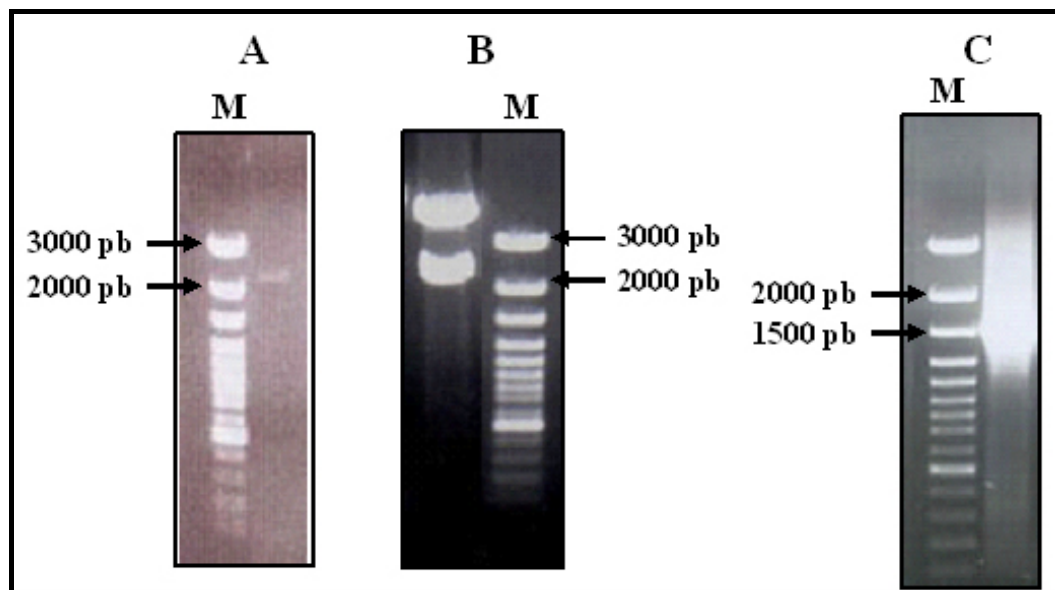


Figura 4.5. Análisis en agarosa 0,7% de amplicones obtenidos para la generación de la construcción GST- Δ N7181L1. (A): Primera amplificación (2160 pb) con los cebadores 18L1FWMO/18L1RWMO realizada sobre una muestra clínica. (B): Amplicón clonado en vector pCR-2.1 TOPO. (C): Producto de amplificación obtenido con los cebadores 18L1FD2/18L1RD2. M: marcador de tamaño molecular.

4.1.2 Clonación en vectores pGEX-4T

Para la expresión de proteínas de fusión en *E. coli* se empleó el vector de alta expresión pGEX-4T-1 en ambos casos, digerido con las enzimas *Eco*RI (construcción GST-18L1Ct) o con las enzimas *Eco*RI/*Xho*I (construcción GST- Δ N7118L1). Los productos de ligación fueron empleados para la transformación de varias cepas de *E. coli*: XL1-Blue y BL21 en ambas construcciones y de células C41(DE3) y C43(DE3) sólo en el caso de la construcción GST- Δ N7118L1. Las células XL1-Blue fueron empleadas por su capacidad para mantener estables los plásmidos, en tanto que las cepas BL21, C41(DE3) y C43(DE3), fueron seleccionadas especialmente para la expresión de proteínas recombinantes.

También se realizaron clonaciones de la construcción correspondiente a la región carboxi-terminal en los vectores pGEX-4-T2 y pGEX-4-T3 (resultados no mostrados), con objeto de comprobar que sólo se producía una inserción en el marco de lectura adecuado en el vector pGEX-4-T1. Se aprovechó la construcción en el vector pGEX-4-T3 (GST-pGEX) para utilizarla como control de inducción de la expresión y para la producción de GST, que en este caso presentaría 29 aminoácidos adicionales derivados del vector y un peso molecular deducido de 29 KDa.

4.1.3 Comprobación de la integridad de las construcciones

Las construcciones fueron secuenciadas con los cebadores 5'pGEX, 3'pGEX, 18L1F600, 18L1F700 y AOXL1-8 (construcción GST- Δ N7118L1) o con los cebadores 5'pGEX, 3'pGEX, MY09, MY11 y 18L1FRn (Figura 3.1).

La secuencia aminoacídica deducida de la proteína de fusión GST-18L1Ct presentó 438 aminoácidos (232 de GST + 206 de 18L1Ct), con un peso molecular de 50 KDa, y un punto isoeléctrico de 8,2.

En el caso de la proteína recombinante correspondiente a la región L1 completa, carente de los primeros 71 aminoácidos (GST- Δ N7118L1), la secuencia aminoacídica deducida presentó 733 aminoácidos (229 de GST + 504 de Δ N7118L1), con un peso molecular de 82,9 KDa y un punto isoeléctrico de 7,5.

Las secuencias obtenidas se alinearon con la seleccionada como referencia, con número de acceso X05015 (Cole & Danos, 1987) corregida por Meissner (Meissner, 1997), que corresponde a un clon de origen Asiático-Amerindio. Con respecto a dicha secuencia, en la construcción GST- Δ N7118L1 (amplificada a partir de la muestra 2V3VPH) encontramos dos bases diferentes en las posiciones 446 y 972 del alineamiento (Anexo 1). Estas diferencias son descritas en clones pertenecientes a la variante europea (Arias-Pulido *et al.*, 2005). Sólo la modificación de la posición 446 produce un cambio de aminoácido en la posición 149 que es conservado.

En cuanto a la construcción GST-18L1Ct (amplificada a partir de la muestra 1V3VPH), encontramos 5 bases diferentes, que no se han podido relacionar con las variantes descritas hasta la fecha. Es de destacar que, en esta construcción, la delección de la adenina en la posición 1692 provocó un cambio en el marco de lectura de modo que los cuatro últimos aminoácidos correspondientes a la proteína L1 pasaron de RARK a VPGR. Además debido a este cambio en el ORF se añaden 15 aminoácidos más al extremo carboxi-terminal, puesto que la interrupción de la traducción se produjo a partir del tercer codón de parada aportado por el vector, en lugar de a partir del segundo (Anexo 1).

4.1.4 Optimización de la producción de proteínas de fusión recombinantes

4.1.4.1 Optimización de la expresión

Una vez comprobada la integridad de la secuencia de los mismos, el siguiente paso fue la optimización de la expresión de la proteína de fusión. Para ello, inicialmente

se trabajó con minicultivos (10 ml), con objeto de determinar las condiciones más adecuadas para la inducción de la expresión. Los parámetros que se analizaron durante la optimización de la misma fueron: medio de cultivo (LB o SOB suplementados con ampicilina), densidad óptica a 600 nm ($D.O_{600}$) del cultivo en el momento de inducción (desde 0,3 hasta 1,7), concentración de IPTG (0,1 a 1 mM), temperatura (temperatura ambiente, 28 y 37°C) y tiempo de inducción (3-20 horas). En cada caso se analizaron extractos crudos de cultivos inducidos y no inducidos (1 ml).

Inicialmente se llevó a cabo la inducción correspondiente a la construcción que expresaba la proteína GST (GST-pGEX). Las condiciones empleadas fueron: medio LB, temperatura de 37°C e inducción del cultivo a una $D.O_{600} = 0,4-0,5$ con IPTG a concentración final 0,8 mM, durante durante 3 horas. Tras el análisis de extractos crudos en SDS-PAGE, se observó una intensa banda a la altura del marcador de 28 KDa que no aparecía en los extractos de cultivos no inducidos. Cuando la inducción se realizaba a 28°C, en lugar de a 37, la expresión era mucho más pobre (Figura 4.6 A).

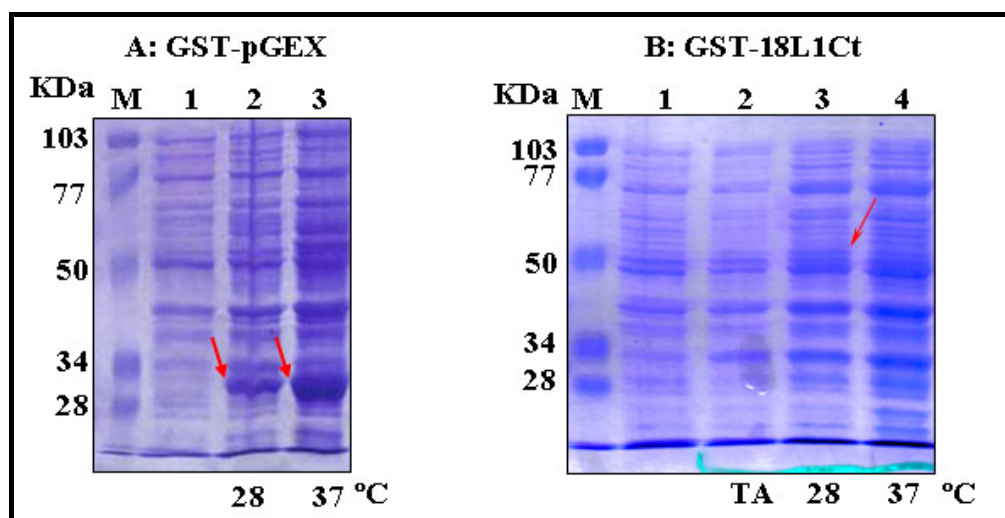


Figura 4.6. SDS-PAGE 10% de extractos crudos de alícuotas de 1 ml de minicultivos. (A) Construcción GST-pGEX, 1: cultivo no inducido, 2 y 3: cultivos inducidos 3 horas. (B) Construcción GST-18L1Ct 1: cultivo no inducido, 2, 3 y 4: cultivos inducidos 3 horas. TA: temperatura ambiente. M: marcador de peso molecular preteñido.

Se comenzó la puesta a punto de la expresión con la proteína de fusión GST-18L1Ct en la cepa BL21, dado que al tratarse de una proteína más pequeña, y probablemente con mayor carácter hidrofílico que la correspondiente a construcción completa, se pensó que la optimización de la expresión sería más sencilla, pudiendo a continuación extrapolar esas condiciones para la expresión de la proteína GST-

Δ N7118L1. Inicialmente las inducciones se realizaron en medio LB, en volúmenes de 10 ml en las mismas condiciones descritas antes para la construcción pGEX-GST. Sin embargo, tras el análisis en SDS-PAGE de los extractos crudos de alícuotas de los cultivos inducidos, no se observó inducción clara de la proteína.

Por ello con ambas construcciones se determinaron empíricamente las condiciones óptimas de expresión, tras múltiples ensayos variando las condiciones de inducción. Se emplearon medios LB y SOB, D.O.₆₀₀ de entre 0,4 hasta 1,7; concentraciones del agente inductor IPTG desde 0,1 a 1 mM, y temperaturas de 28°C, 37°C, y temperatura ambiente. Inicialmente se indujeron los cultivos en medio LB durante un máximo de 3 horas. De este modo, se determinó que las mejores condiciones de inducción de la proteína GST-18L1Ct correspondían a D.O.₆₀₀ de 0,5 con IPTG 0,8 mM a 28°C (Figura 4.6 B) y que las condiciones óptimas para la inducción de la proteína GST- Δ N7118L1 eran sobre cultivos con D.O.₆₀₀ en torno a 1, inducidos con IPTG 1mM, a temperatura de 28°C (Figura 4.7).

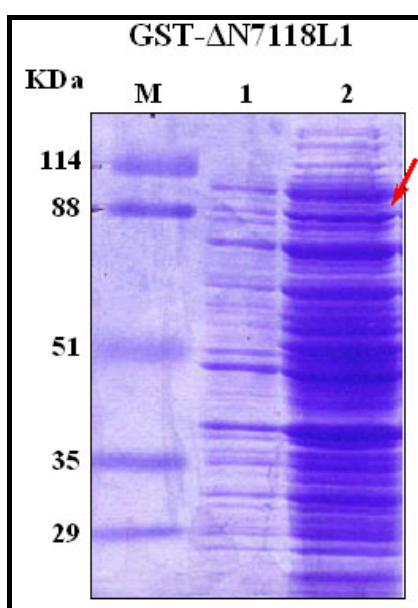


Figura 4.7. SDS-PAGE 10%. Análisis de extractos crudos de alícuotas de 1 ml de minicultivos para la construcción GST- Δ N7118L1. 1: no inducido, 2: inducido 4 horas. La flecha roja indica una banda muy tenue del tamaño esperado (~83 KDa). M: marcador de peso molecular preteñido.

A continuación, estos mismos ensayos se realizaron empleando las mismas condiciones, pero aumentando el tiempo de inducción a 16-20 horas, para tratar de aumentar la cantidad de proteína producida. No obstante, dada la gran cantidad de bandas presentes en los geles, no se pudo identificar fácilmente la proteína recombinante mediante análisis de los extractos crudos en SDS-PAGE, y ésta sólo fue claramente detectable tras la separación de fracciones soluble y no soluble. Finalmente

se determinó que la inducción de la expresión de ambas construcciones era aún mejor cuando se realizaba en medio SOB.

Por último, en estas condiciones establecidas como óptimas para la proteína GST- Δ N7118L1, se realizaron también expresiones en las cepas C41(DE3) y C43(DE3), resistentes a la producción de proteínas tóxicas para las células. Se observó una banda de tamaño esperado en la fracción no soluble, más intensa en las inducciones realizadas en la cepa C43 (Figura 4.8). A pesar de los buenos resultados obtenidos, no se pudo trabajar con estas cepas porque fueron cedidas al final del periodo de investigación.

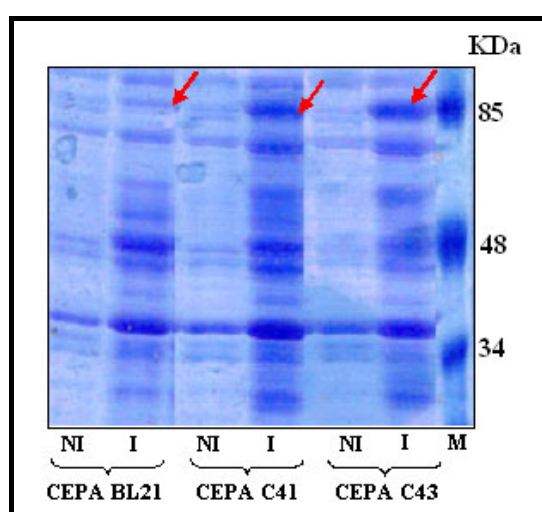


Figura 4.8. SDS-PAGE 10%. Análisis de extractos crudos de cepas transformadas con la construcción GST- Δ N7118L1. La flecha roja indica una banda de tamaño esperado, correspondiente a la proteína de fusión (~83 KDa) NI: cultivo no inducido, I: cultivo inducido. M: marcador de peso molecular preteñido.

4.1.4.2 Procesamiento de los cultivos inducidos

Dada la escasa cantidad de proteínas recombinantes detectadas en los extractos crudos para ambas construcciones, se procedió a la separación de fracciones (soluble y no soluble) para determinar la posible pérdida de la proteína en la fracción no soluble por la formación de cuerpos de inclusión. Se emplearon para ello dos técnicas. Una de ellas se basó en la solución comercial B-PER, que contiene un detergente no iónico suave que elimina la necesidad de usar métodos de ruptura mecánica. La segunda técnica se basó en la lisis mediante sonicación en Tampón de sonicación A (constituido por PBS 1X, Tabla 3.9). Así, tras el análisis en SDS-PAGE 10%, para la proteína GST-18L1Ct se observó una banda de 50 KDa, en la fracción no soluble, más intensa en el experimento de sonicación, y que no apareció, o apareció muy tenue en la fracción soluble. En el caso de la construcción GST- Δ N7118L1, se observó también una banda de tamaño esperado (83 KDa) (Figura 4.9).

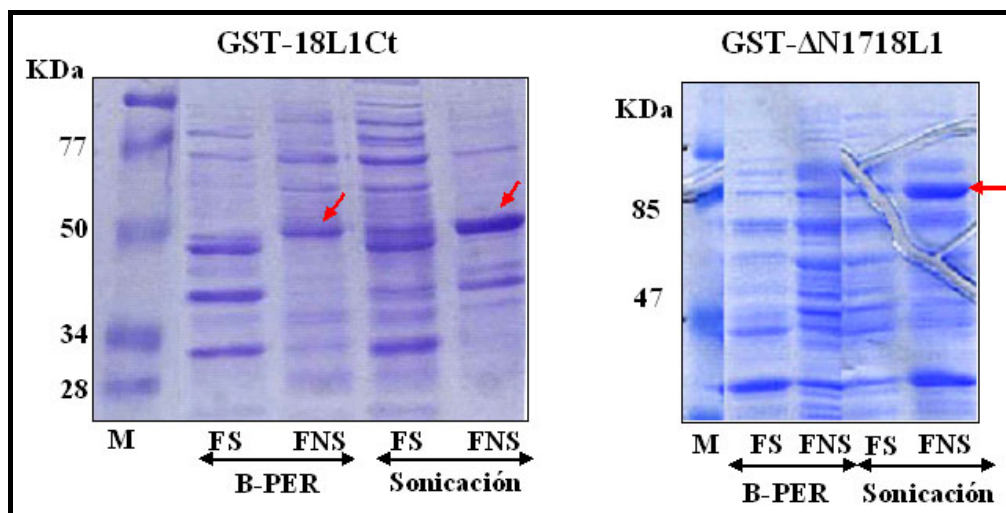


Figura 4.9. SDS-PAGE 10% de alícuotas de distintas fracciones de ensayos de expresión de las proteínas de fusión recombinantes en minicultivos. FS: fracción soluble, FNS: fracción no soluble. M: marcador de peso molecular. Las flechas rojas indican las proteínas recombinantes aparecidas en la fracción no soluble en cada caso.

Se determinó por tanto la sonicación como el mejor método de ruptura celular, apreciándose la presencia de la proteína en la fracción no soluble. Se decidió así modificar las condiciones de ruptura y solubilizar la proteína contenida en la fracción insoluble para incrementar la producción. Así, se realizó la lisis por sonicación en presencia de agentes reductores como DTT y de lisozima (Tampón de sonicación B, Tabla 3.9).

4.1.4.3 Purificación de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad

a) Cromatografía de afinidad en suspensión

La purificación se basó en el uso de una resina de sefarosa acoplada con glutation (apartado 3.2.14.1, d), aplicándose la técnica inicialmente a la proteína GST-18L1Ct.

Primero se realizó la purificación por cromatografía de afinidad de la fracción soluble y no soluble resuspendida en PBS, variando los tiempos de unión a la resina, para incrementar la recuperación de la proteína de interés. Las eluciones de la cromatografía y las muestras no unidas, se analizaron en SDS-PAGE. Se observó una pequeña banda de tamaño esperado (50 KDa) en la primera y segunda elución (Figura 4.10, A). La unión de proteínas a la resina durante toda la noche, no pareció mejorar

sustancialmente la recuperación posterior, por lo que a partir de este momento, las uniones se realizaron siempre a temperatura ambiente, durante un máximo de 3 horas.

Dado que la recuperación de las proteínas recombinantes no era buena, se decidió solubilizar las proteínas contenidas en la fracción no soluble en tampón de solubilización A (Tabla 3.10), que contenía detergentes como el SDS y el Tween20, antes de su purificación mediante cromatografía de afinidad en suspensión. Se observó un claro incremento en la recuperación de proteína en las eluciones de la cromatografía (Figura 4.10, B). En este experimento se comprobó también si la realización de una elución durante un largo periodo de tiempo (12 horas) a 4°C incrementaba el rendimiento, observándose una clara degradación de las proteínas (Figura 4.10, B última calle).

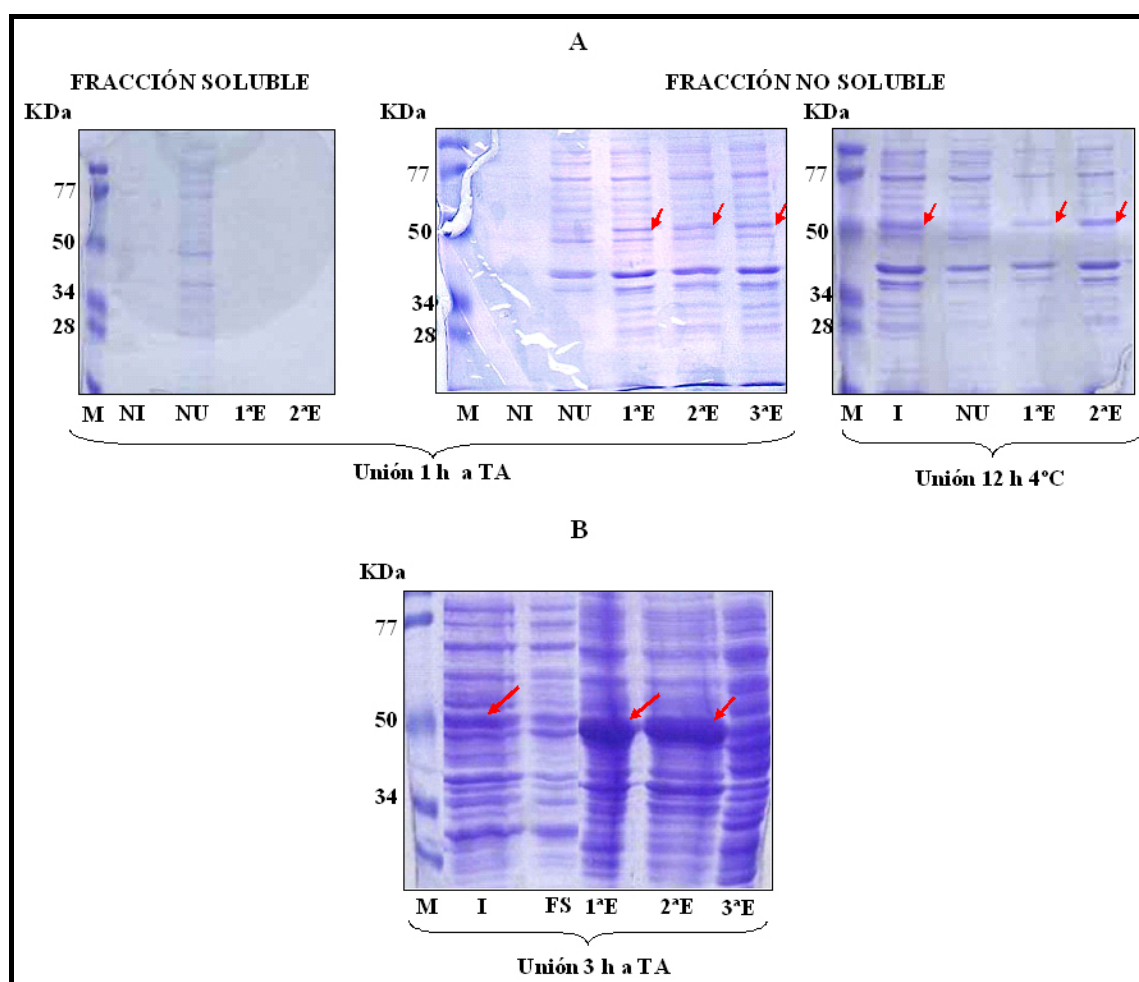


Figura 4.10. SDS-PAGE 10% de las fracciones recogidas de la purificación mediante cromatografía de afinidad en suspensión de la proteína recombinante GST-18L1Ct. **(A)** Fracción soluble y fracción no soluble de minicultivos. **(B)** Fracción no soluble solubilizada de midicultivos. NI: extracto crudo de alícuotas no inducidas, NU: fracción de proteínas no unidas a la sefarosa, E: eluciones de proteínas unidas a la sefarosa, I: extractos crudos de alícuotas de cultivo inducido. M: marcador de peso molecular. TA: temperatura ambiente. Las flechas rojas indican una banda de 50 KDa, eluida de la resina, que se corresponde con el tamaño de la proteína GST-18L1Ct.

Este protocolo se aplicó también a midicultivos (50 ml) inducidos en medio SOB y LB. Aunque las diferencias no fueron excesivas, parece que la recuperación de proteína fue mayor cuando se empleó medio SOB, lo que confirmó nuestras observaciones iniciales. (ver Figura 4.11).

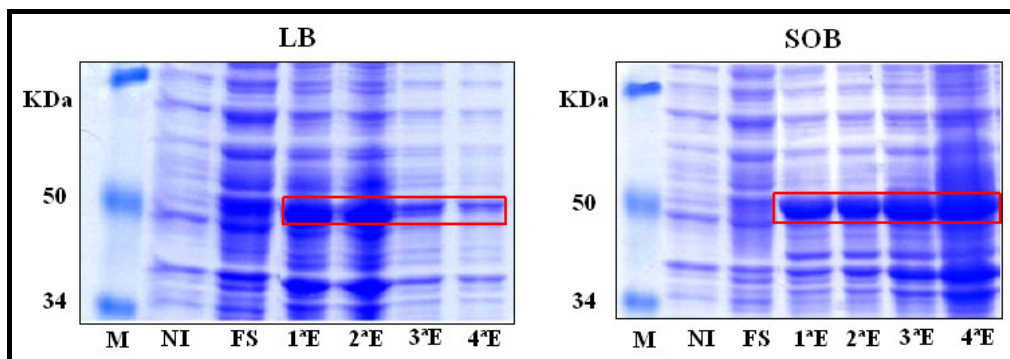


Figura 4.11. SDS-PAGE 10% de las fracciones recogidas de la purificación mediante cromatografía de afinidad en suspensión de 50 ml de cultivo inducido. NI: extractos crudos de alícuotas de cultivo no inducido, FS: Fracción soluble, E: eluciones. Recuadrado en rojo las bandas de 50 KDa, eluidas de la resina, correspondiente a la proteína GST-18L1Ct. M: marcador de peso molecular preteñido.

b) Cromatografía de afinidad en columna

Dada la escasa pureza de las proteínas recombinantes obtenidas por la cromatografía de afinidad en suspensión y la necesidad de producir proteína en mayores cantidades, se decidió que podría resultar menos compleja la purificación empleando la cromatografía de afinidad en columnas. Así, se desarrollaron diferentes experimentos, con la construcción completa GST-ΔN7118L1, modificando tanto los tratamientos de las células, con objeto de solubilizar la proteína, como los protocolos del proceso cromatográfico con objeto de incrementar el rendimiento y pureza de la proteína recuperada de la columna. El procedimiento estándar, sobre el que se realizaron las modificaciones, se detalla en materiales y métodos (apartado 3.2.14.1, Figura 3.3). Los tampones utilizados para la sonicación y solubilización se detallan en las tablas 3.9 y 3.10, y los empleados en la cromatografía en la tabla 3.11.

- ✓ **PROCEDIMIENTO A:** en éste, tras la lisis celular por sonicación en tampón B, se realizó la solubilización de la fracción no soluble en Tampón B. La purificación por cromatografía de afinidad se realizó mediante equilibrado de columnas y lavado con tampón U. En el gel correspondiente a las fracciones de la elución, se pudo observar una banda intensa a la altura del marcador de 85 KDa, y justo por debajo del mismo

una banda bastante menos intensa. Además se observó la presencia de una tercera banda entre los marcadores de 85 y 48 KDa. Las proteínas eluyeron de la columna fundamentalmente en las tres primeras fracciones de la elución (Figura 4.12, Procedimiento A).

- ✓ **PROCEDIMIENTO B:** en este experimento se aplicó urea para tratar de eliminar las proteínas que eluían junto con la de interés. Para ello se aplicaron algunas variantes con respecto al procedimiento A. En primer lugar, la solubilización se realizó en Tampón C conteniendo urea, aunque la muestra fue dializada frente a Tampón B antes de su aplicación en las columnas. El equilibrado de éstas se realizó en tampón U, que fue empleado también para los lavados si bien se llevó a cabo un lavado adicional con tampón UII. En este caso no se observó ninguna banda en las fracciones de la elución, y una banda del tamaño de nuestra proteína de fusión, fue claramente visible en la primera alícuota del lavado con Tampón U II (Figura 4.12, Procedimiento B), probablemente debido a la interferencia de la urea en la capacidad de unión de la columna, a pesar de que el fabricante indica la resistencia de éstas a dicho agente.
- ✓ **PROCEDIMIENTO C:** en este caso, también con objeto de eliminar proteínas coeluyentes, se realizó la sonicación en Tampón B, y la fracción no soluble se solubilizó en los tampones D o E (este último carente de detergentes) conteniendo ambos ATP y $MgCl_2$ (Chen *et al.*, 2001). Tras estos tratamientos se añadió urea a concentración de 3,5M a ambas muestras, con posterior diálisis frente a Tampón de sonicación L. La muestra previamente clarificada se sometió a purificación por cromatografía. El equilibrado y los lavados de la columna se realizaron con tampón L. En este caso, se pudo observar la presencia de múltiples bandas en las fracciones de la elución, y sólo una de ellas muy tenue parecía poder corresponderse con la proteína de fusión (Figura 4.12, Procedimiento C).
- ✓ **PROCEDIMIENTO D:** se siguió el protocolo descrito por Chen y colaboradores (Chen *et al.*, 2001), que incluyó lisis en Tampón de sonicación C y adición directa de ATP y $MgCl_2$, y urea 3,5 M. Tras el tratamiento la muestra se dializó frente a tampón de sonicación L. La modificación con respecto al protocolo publicado, radica en que, en nuestro caso se llevó a cabo nuevamente la separación de

fracciones, tomando la fracción no soluble que se solubilizó en Tampón B, antes de aplicarla en la columna. El resto del procedimiento fue igual al descrito en el caso A. Las fracciones del eluato recogidas tras la cromatografía presentaron múltiples bandas, una de ellas más intensa, de peso molecular correspondiente al esperado para nuestra proteína. Para contrastar resultados, las células procedentes de otros 500 ml de cultivo inducido al mismo tiempo, se sometieron a purificación como en el procedimiento A. En este caso se observó la presencia de una banda a la altura esperada (aproximadamente 83 KDa), observándose nuevamente dos bandas más, igual que en el experimento A (Figura 4.12 D).

De aquí en adelante, se realizó la purificación empleando los parámetros que se utilizaron en el procedimiento A. La mayor parte de las inducciones restantes se realizaron procesando 50 ml de cultivos inducidos en forma de minicultivos, puesto que las condiciones de aireación generadas en este sistema favorecían la expresión de la proteína.

Aunque con menor contaminación que en el caso de cromatografía en suspensión, se siguió observando la presencia de proteínas que coelúan junto con la proteína de interés, especialmente una proteína de 60 KDa (ver experimento A o D) que podría corresponder con las descritas por otros autores, identificadas como chaperonas bacterianas, implicadas en el plegamiento proteico. En concreto, se ha descrito anteriormente la coelución de la chaperona GroEL de *E. coli*, cuando se purificaban las proteínas L1 de VPH16 y 11 producidas en este organismo (Chen *et al.*, 2001).

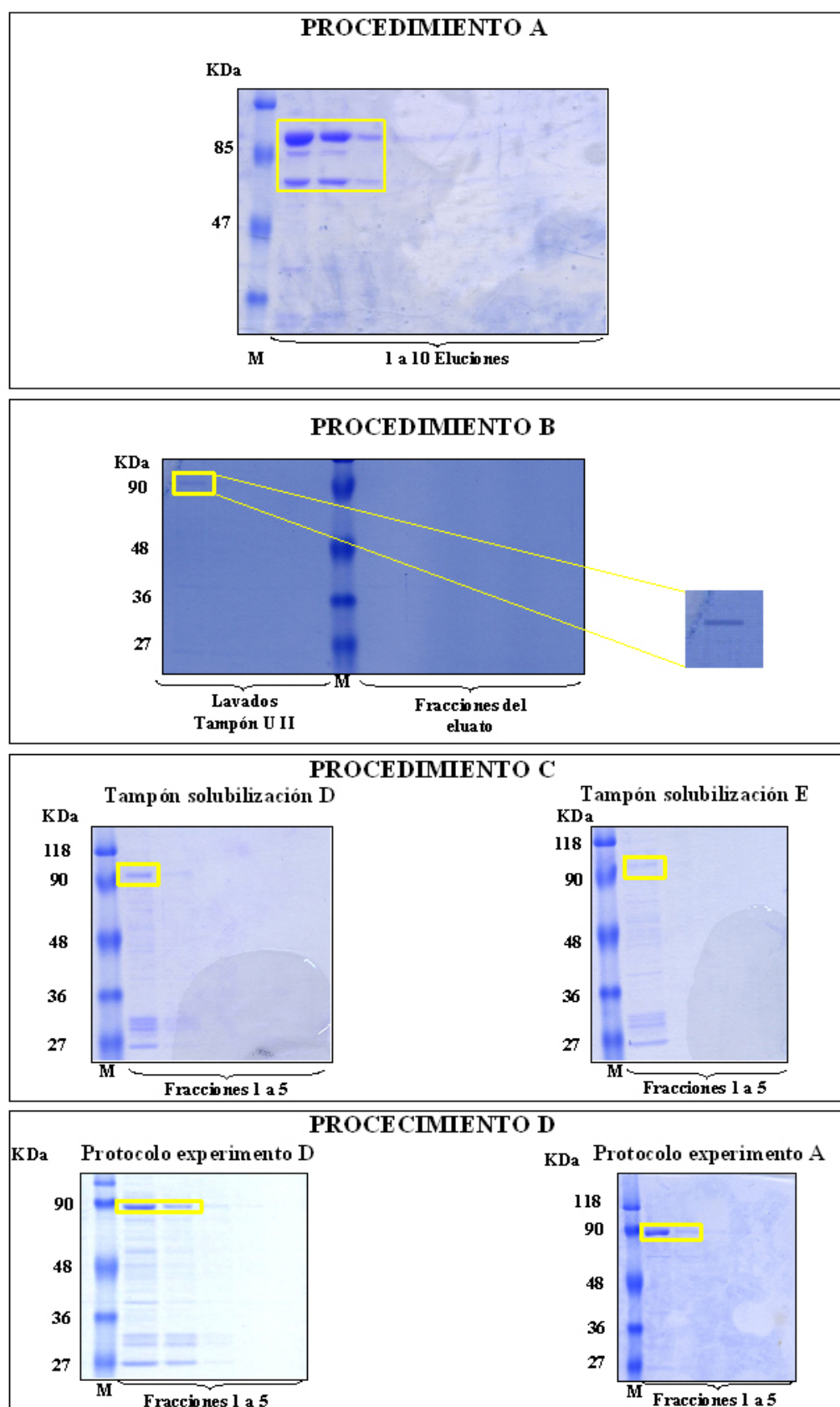


Figura 4.12. SDS-PAGE 10% de muestras de la proteína recombinante GST-ΔN7118L1 purificadas mediante cromatografía de afinidad en columna, empleando cuatro procedimientos de lisis, solubilización y tratamiento de la columna cromatográfica diferentes (Procedimientos A, B, C y D). En el recuadro amarillo se muestran las bandas correspondientes a la proteína de fusión. M: marcador de peso molecular.

4.1.4.4 Purificación de eluciones obtenidas por cromatografía de afinidad

Dado que las eluciones de la cromatografía de afinidad en suspensión estaban constituidas por muchas más proteínas que la proteína GST-18L1Ct, y las eluciones de la cromatografía de afinidad en columna de la proteína GST-ΔN7118L1 parecían presentar chaperonas coprecipitantes, se decidió aumentar la pureza de las proteínas de interés sometiendo a dichas eluciones cromatográficas a diversos procesos de purificación (ver procedimiento en apartado 3.2.14.1, e). Para ello, las eluciones y que contenían las proteínas de fusión se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, realizándose la escisión directa de las bandas de interés del gel precipitadas con KCl frío, que no interferiría en el proceso posterior de purificación.

La proteína GST-18L1Ct se purificó mediante electroelución en PBS, obteniéndose concentraciones del orden de 200 µg/ml, lo que supuso un rendimiento de 1,2 mg/L de cultivo inducido (Figura 4.13, A).

La proteína completa GST-ΔN7118L1 se purificó empleando este mismo método y aunque en las tinciones con azul Coomassie sólo se observó una banda, en las inmunodetecciones realizadas con posterioridad, se observó una vez más, la contaminación con la proteína de 60 KDa. Por ello, se empleó un nuevo método de purificación realizando una elución de los fragmentos de acrilamida en PBS 1X conteniendo urea 3,5 M, para facilitar la separación de la posible chaperona de la proteína L1 recombinante (Figura 4.13, B). En este caso, se observa una ligera diferencia de movilidad electroforética de la proteína en el gel, con respecto a la electroeluida en PBS, probablemente debido a la ruptura de algunos puentes disulfuro al incubarse con urea. En este caso la proteína se recuperó en concentraciones de 70-100 µg/ml (rendimiento de 1 mg/L de cultivo).

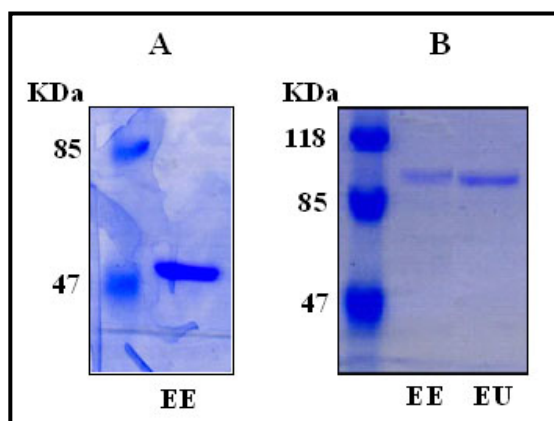


Figura 4.13. Purificaciones de eluciones cromatográficas mediante electroelución en PBS (EE) y elución en PBS/urea (EU) separadas en SDS-PAGE al 10%. **(A)** Proteína GST-18L1Ct. **(B)** Proteína GST-ΔN7118L1.

4.1.4.5 Purificación directa de proteínas recombinantes mediante electroelución en PBS o elución en PBS con Urea

El método de tinción con KCl y elución o electroelución se aplicó también para recuperar la proteína GST- Δ N7118L1 directamente a partir de la fracción no soluble, solubilizada en Tampón de solubilización B. A partir de dicha muestra fraccionada mediante SDS-PAGE se escindieron las bandas de interés procediendo a recuperar la proteína mediante elución en PBS/urea o electroelución.

La proteína se recuperó en concentraciones en torno a 150-170 μ g/ml por ambos métodos (Figura 4.14).

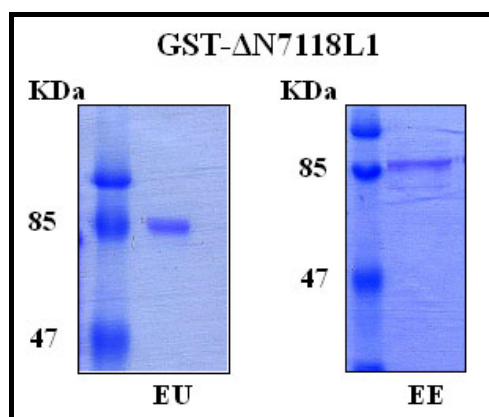


Figura 4.14: Purificación de la proteína GST- Δ N7118L1 directamente desde la fracción no soluble mediante elución en PBS/urea (EU) y mediante electroelución (EE) separadas en SDS-PAGE al 10%.

Además este fue el método seleccionado para la purificación de la proteína GST, realizando sonicación en Tampón de sonicación A, y procesando la fracción soluble que contenía la proteína. Tras la separación electroforética se realizó la escisión de una banda situada entre los marcadores de 36 y 27 KDa, de peso molecular deducido de 29 KDa. La proteína se recuperó en concentraciones de 200 a 300 μ g/ml (Figura 4.15).

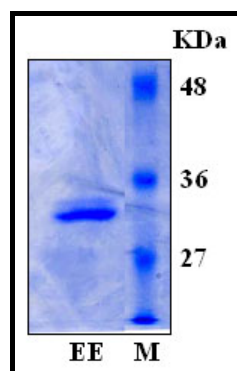


Figura 4.15. Purificación de la proteína GST mediante electroelución (EE) en PBS. M: marcador de peso molecular preteñido.

4.1.5 Caracterización inmunológica de las proteínas recombinantes con sueros comerciales y sueros animales

a) Comprobación de la identidad de las bandas detectadas en SDS-PAGE, mediante análisis por *Western blot* con anti-GST

Para comprobar que las bandas que se fueron detectando en cada paso de la optimización, correspondían con las proteínas recombinantes, se realizaron ensayos de inmunodetección mediante WB, empleando un anticuerpo Anti-GST (Tabla 3.16) dirigido a la proteína GST presente en el extremo N-terminal de las proteínas de fusión producidas. Se observaron bandas a la altura esperada (aproximadamente 50 KDa para la proteína GST-18L1Ct, y 83 KDa para la proteína GST-ΔN7118L1). También se comprobó la identidad de la proteína GST, producida mediante expresión de la construcción clonada en el vector pGEX-4T-2, apareciendo una banda próxima al marcador de 27 KDa (Figura 4.16).

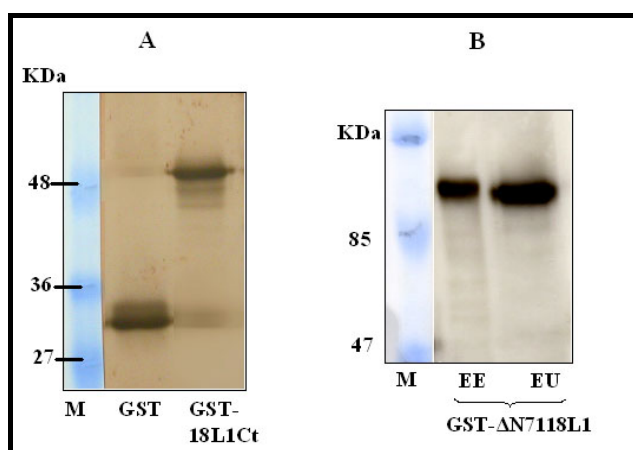


Figura 4.16. Inmunodetección de las proteínas de fusión con Anti-GST, revelados con DAB. **(A)** GST y GST-18L1Ct electroeluidas en PBS. **(B)** GST-ΔN7118L1 electroeluida en PBS (EE) y eluida en PBS/urea (EU). M: marcador de peso molecular preteñido.

b) Comprobación del carácter antigénico mediante el uso de anticuerpos comerciales anti-VPH

Para determinar el carácter antigénico de las proteínas producidas, se realizaron ensayos de WB empleando dos anticuerpos comerciales (Tabla 3.16) (cóctel IH8, y el anticuerpo monoclonal HPV-4C4). Cuando la inmunodetección se realizó sobre la proteína GST-18L1Ct no se detectaron bandas ni en extractos crudos, ni en muestras procedentes de proteína purificada. Sin embargo, la proteína GST-ΔN7118L1 (electroeluida en PBS y eluida en PBS con urea), fue detectada empleando ambos anticuerpos (Figura 4.17).

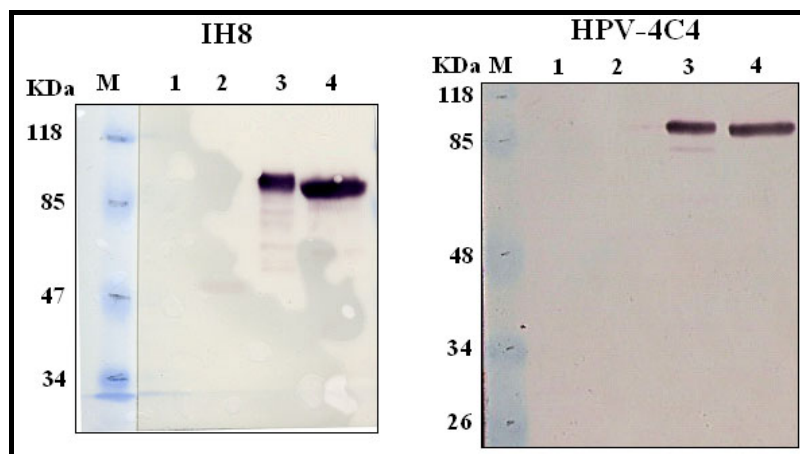


Figura 4.17. Análisis de proteínas recombinantes por WB con anticuerpos anti-VPH comerciales IH8 y HPV-4C4. 1: GST comercial (2 μg); 2: proteína GST-18L1Ct electroeluida en PBS (2 μg); 3: proteína GST-ΔN7118L1 electroeluida en PBS (3 y 2 μg respectivamente); 4: proteína GST-ΔN7118L1 eluida PBS/urea (3 y 2 μg respectivamente). M: marcador de peso molecular preteñido.

c) Comprobación del carácter antigénico mediante el uso de sueros hiperinmunes obtenidos en ratón

Los sueros hiperinmunes obtenidos mediante inmunización con la proteína GST-18L1Ct (apartado 3.2.13.1) fueron enfrentados en WB a las proteínas recombinantes desarrolladas en *E. coli* (GST, GST-18L1Ct y GST-ΔN7118L1). Se produjo reconocimiento específico en todos los casos (Figuras 4.18 y 4.19 A).

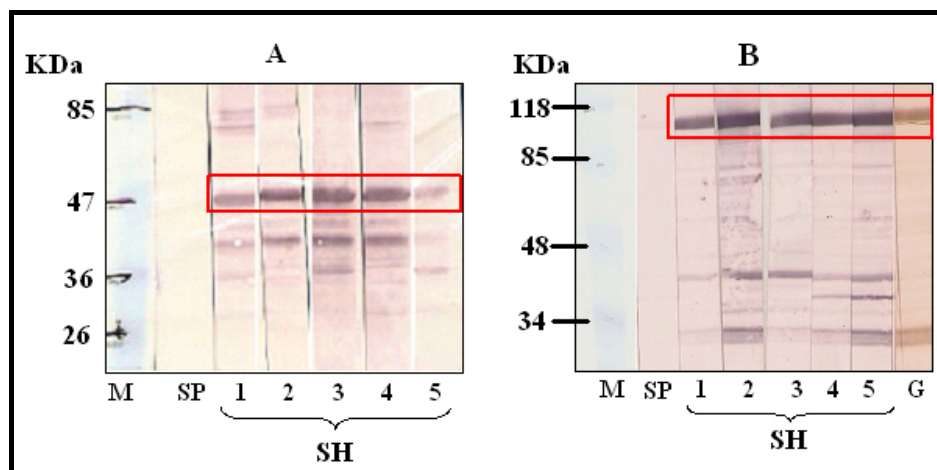


Figura 4.18. Inmunodetecciones realizadas con cada uno de los cinco sueros hiperinmunes de ratón obtenidos (dilución 1:50). (A) GST-18L1Ct purificada por cromatografía de afinidad en suspensión; (B) proteína GST-Δ7118L1 purificada mediante cromatografía de afinidad en columna. Recuadradas en rojo las bandas correspondientes a las proteínas recombinantes en cada caso. SP: Suero preimmune, SH: suero hiperimmune, G: anti GST, M: marcador de peso molecular preteñido.

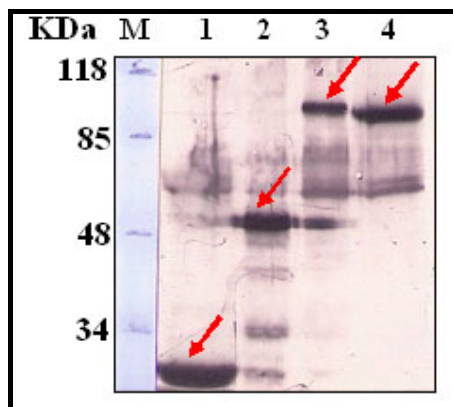


Figura 4.19. Inmunodetección realizada con una mezcla de sueros hiperinmunes de ratón (dilución 1:100). 1: GST comercial; 2: GST-18L1Ct electroeluida; 3: GST- Δ N7118L1 electroeluida; 4: GST- Δ N7118L1 eluida en PBS con urea. Las flechas rojas indican las bandas correspondientes a las proteínas de interés en cada caso. M: marcador de peso molecular preteñido.

El hecho de que los sueros hiperinmunes se mostrasen también reactivos a la proteína GST producida en el laboratorio, así como a la proteína GST comercial, demostraba que al menos contenían anticuerpos frente a epítomos presentes en dicha proteína. Para comprobar si existía reconocimiento específico de la proteína L1 recombinante, los sueros hiperinmunes se enfrentaron también a extractos crudos de células de insecto que expresaban la proteína Δ N6118VLP carente de GST (apartado 4.3). Se obtuvo una banda de tamaño aproximado 55 KDa (Figura 4.20), correspondiente a la proteína L1, que también se obtenía cuando se emplearon los anticuerpos comerciales. Estos datos mostraron que se trata de sueros policlonales que reconocen epítomos de la proteína GST, así como epítomos de la proteína L1 de VPH18.

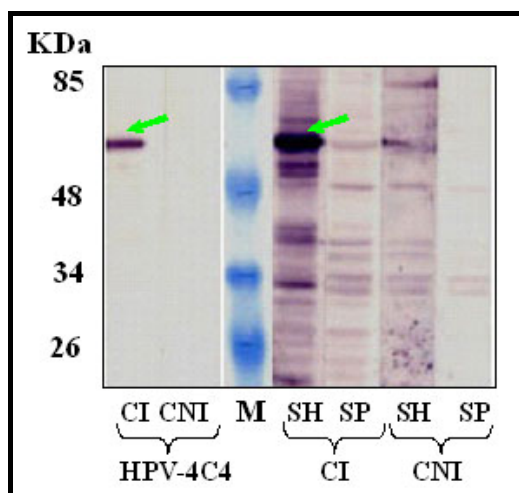


Figura 4.20. Inmunodetecciones realizadas con una mezcla de sueros hiperinmunes de ratón (dilución 1:100) enfrentados a la proteína Δ N6118VLP producida en células de insecto. Como control positivo se ha empleado el anticuerpo monoclonal HPV-4C4. CI: células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes, CNI: células de insecto no infectadas, SP: Suero preinmune de ratón, SH: suero hiperinmune de ratón. M: marcador de peso molecular preteñido.

Finalmente, también mostraron reactividad frente a la proteína GST- Δ N2016L1, producida, en nuestro laboratorio (Figura 4.21) (Bosch, 2008). Este resultado pudo ser debido a reconocimiento de la proteína GST fusionada al extremo amino-terminal de esta proteína recombinante, y/o a reactividad cruzada entre el tipo 16 y el 18.

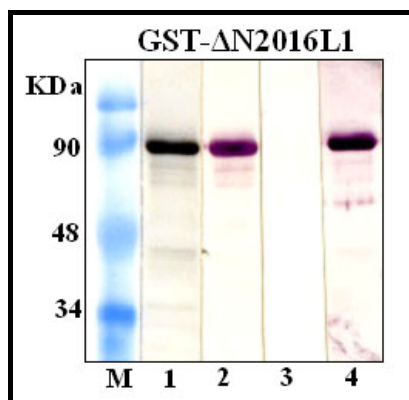


Figura 4.21. Análisis por *Western blot* de proteína GST-ΔN2016L1 purificada por electroelución. (1) Anti-GST; (2) Cóctel IH8; (3) Suero preinmune de ratón; (4) Suero hiperinmune de ratón.

Sin embargo, los sueros de ratón obtenidos tras la inmunización con ADN (apartado 3.2.13.2), no reconocieron ninguna de las dos proteínas recombinantes (GST-18L1Ct y GST-ΔN7118L1), así como tampoco se mostraron reactivos a extractos crudos de células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que expresaban la proteína ΔN6118VLP (Figura 4.22).

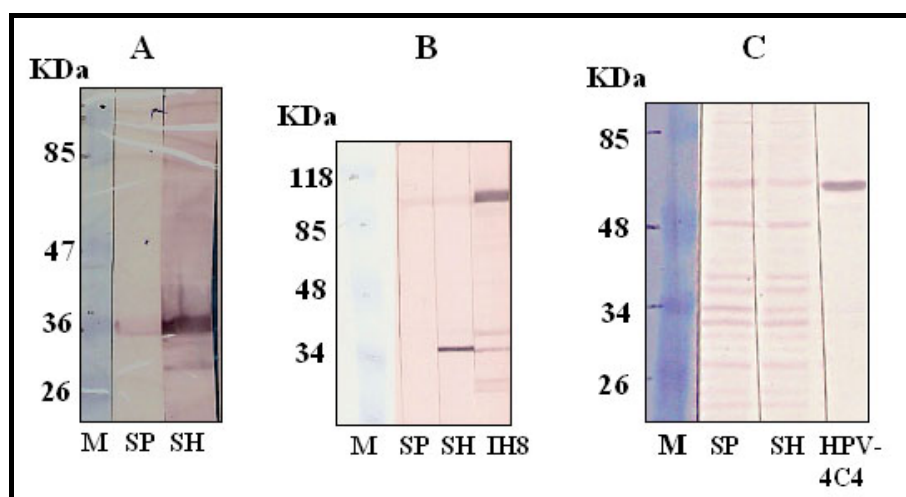


Figura 4.22. Inmunodetecciones empleando sueros preinmunes (SP) e hiperinmunes (SH) de ratón, obtenidos mediante inoculación con ADN de L1 de VPH18. (A) Sueros obtenidos mediante inoculación intramuscular enfrentados a la proteína GST-ΔN7118L1. (B) Sueros obtenidos por inoculación intravenosa enfrentados a la proteína GST-ΔN7118L1 purificada mediante cromatografía de afinidad en columna. (C) Sueros obtenidos mediante inoculación intravenosa enfrentados a proteína ΔN6118VLP producida en células de insecto. IH8: cóctel anti-VPH18; HPV-4C4: anticuerpo HPV-4C4; M: marcador de peso molecular preteñido.

4.1.6 Caracterización inmunológica de las proteínas recombinantes con sueros humanos mediante ensayos inmunoenzimáticos

a) Caracterización mediante análisis por *Western blot*

Inicialmente se realizaron varios ensayos, con un total de 19 sueros humanos de los cuales 7 pertenecían a pacientes caracterizados genéticamente, mediante

Resultados

secuenciación, como infectados con VPH tipo 18 (muestras GP1 a GP7) y 2 a pacientes caracterizados genéticamente como no infectados con VPH de alto riesgo (GN1 y GN2). También se analizaron 9 plasmas de hemodonantes (HD1 a HD9). Finalmente en los ensayos se incluyó una mezcla de plasmas de hemodonantes de origen humano (muestra PG=Plasma Grifols, apartado 3.1.5). Todos los sueros fueron utilizados a dilución 1/50.

En los primeros ensayos, se emplearon como antígenos, la proteína GST-18L1Ct y la proteína GST- Δ N7118L1 purificada mediante electroelución en PBS directamente desde la fracción no soluble. Se utilizaron de 2,5 a 4 μ g de cada uno de los antígenos en cada inmunodetección. Se pudo comprobar que la proteína recombinante GST-18L1Ct no era reconocida por los sueros humanos mientras sí parecía existir reconocimiento de la proteína completa (Figura 4.23). Los sueros de pacientes en este caso parecían reconocer tres bandas, en tanto que en la inmunodetección realizada con el anticuerpo anti-GST, aparecía una única banda, más gruesa, que podría corresponder con la banda central, o con las bandas central y superior. Las bandas restantes podrían corresponder con proteínas contaminantes de *E. coli* arrastradas junto con las proteínas de fusión, al cortar la banda de los geles de poliacrilamida para eluirla posteriormente. También podría tratarse de proteína de fusión degradada.

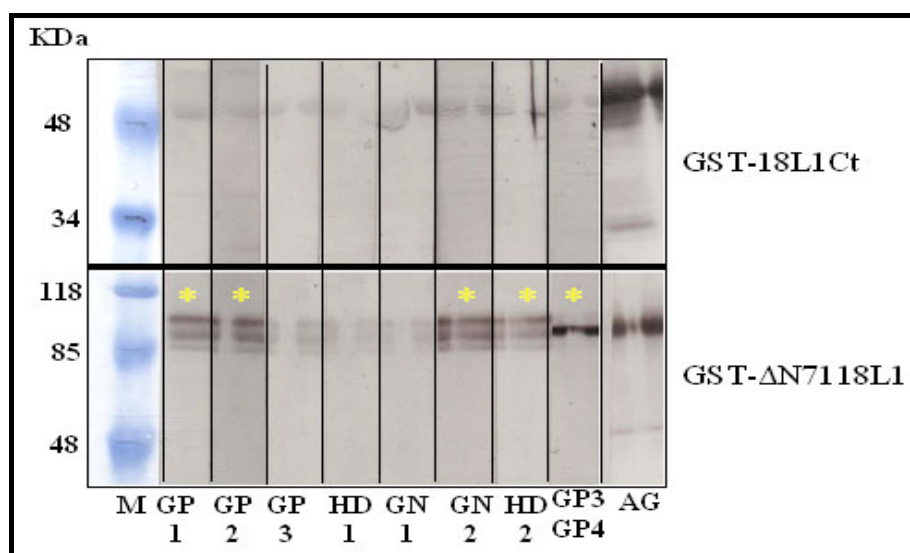


Figura 4.23. Inmunodetección con sueros y plasmas humanos, de pacientes (GP: genéticamente caracterizados como infectados con VPH, GN: genéticamente caracterizados como no infectados con VPH) y hemodonantes (HD) enfrentados a las proteínas de fusión GST-18L1Ct y GST- Δ N7118L1 purificada directamente de la fracción no soluble mediante electroelución en PBS. AG: anti-GST. M: marcador de peso molecular preteñido. Los asteriscos señalan las calles en que se reconoce la proteína GST- Δ N7118L1. GP3 GP4: mezcla de dos sueros genéticamente caracterizados como infectados con VPH18.

En los siguientes ensayos la proteína GST- Δ N7118L1 fue purificada mediante cromatografía de afinidad en columna seguida de elución en PBS/urea o electroelución en PBS. Con esto se pretendió aumentar la pureza de la proteína recombinante para comprobar si de este modo, tras la inmunodetección con sueros humanos mediante WB se obtenía una única banda, correspondiente a la proteína de fusión. Además, las inmunodetecciones se realizaron con los sueros diluidos a la misma concentración (1/50) en el mismo tampón, pero se incubaron durante toda la noche a +4°C con objeto de tratar de incrementar la señal. Como controles positivos se incluyeron los sueros hiperinmunes de ratón y el cóctel IH8. Así se observaron bandas claras en las tiras incubadas con los tres controles (Figura 4.24). Además se observó que las muestras humanas que reaccionaban con la proteína recombinante (HD3, HD4, PG, GN1 y GP1) reconocían dos bandas tanto en la proteína electroeluida en PBS como purificada en PBS/urea. Estas dos bandas eran más claramente visibles en el caso de la proteína purificada en presencia del agente desnaturalizante. Además, en muchas de las tiras incubadas con sueros, se observó una segunda banda por debajo del marcador de 85 KDa que podría corresponder con la chaperona que eluye acompañada con la proteína de fusión, ya descrita con anterioridad.

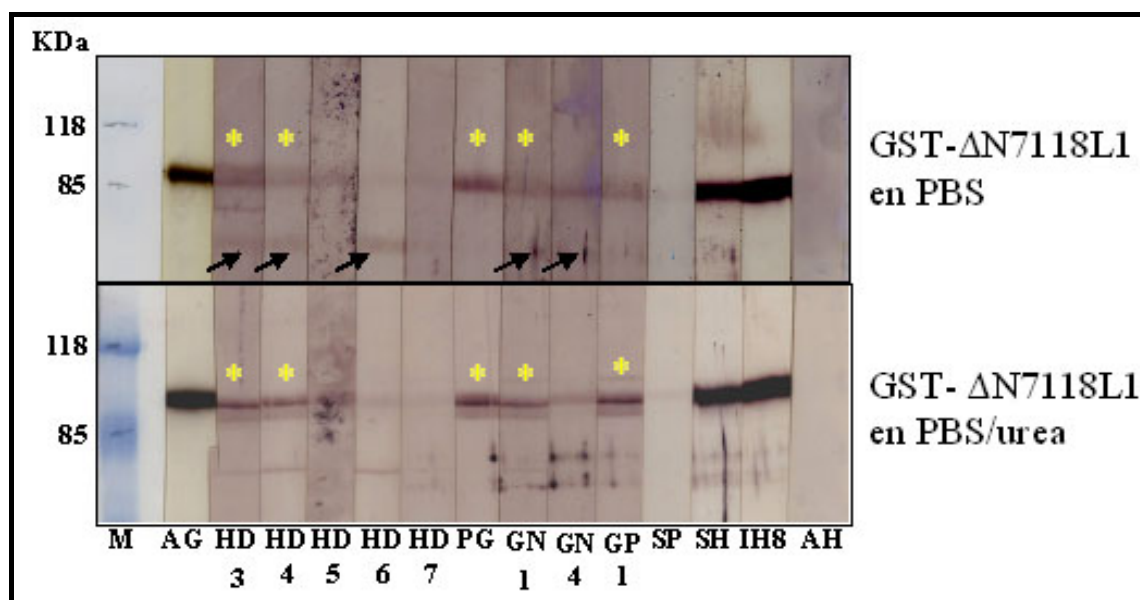


Figura 4.24. Inmunodetección con sueros y plasmas humanos en geles preparativos de la proteína GST- Δ N7118L1 electroeluida en PBS o eluida en PBS/urea, realizada con sueros humanos. HD: plasmas de hemodonantes, GN: sueros de pacientes caracterizados genéticamente como no infectados con VPH, GP: sueros de pacientes caracterizados genéticamente como infectados con VPH, PG: plasma Grifols, SP: suero preinmune de ratón, SH: suero hiperinmune de ratón, IH8: cóctel IH8, AH: conjugado anti-humano. M: marcador de peso molecular preteñido. Los asteriscos señalan las muestras en las que se produce reconocimiento por los sueros humanos. Las flechas negras indican las muestras que reconocen una banda de peso molecular de aproximadamente 60KDa.

Se realizó una selección de sueros que parecían reconocer nuestra proteína recombinante (HD3, HD4, PG y GP1), y otros que no lo hacían (HD6, HD7, HD8) con objeto de conseguir una mezcla de sueros que manifestasen reconocimiento de nuestras proteínas recombinantes y otra que no y determinar así la especificidad de las bandas reconocidas, mediante comparación con los sueros comerciales. Para ello se realizó un proceso de doble inmunodetección llevando a cabo la eliminación del primer anticuerpo y su conjugado para realizar una segunda incubación con otros sueros (apartado 3.2.15.7). Las muestras humanas y animales se enfrentaron en WB, a la proteína GST-18L1Ct purificada por cromatografía y eluida en PBS, y a la proteína GST-ΔN7118L1 purificada por cromatografía y eluida en PBS/urea o electroeluida en PBS. Estas proteínas además se enfrentaron a los sueros hiperinmunes de ratón, al cóctel IH8 y al anticuerpo anti-GST (Figura 4.25).

Así, la mezcla de sueros positivos pareció detectar bandas correspondientes a la proteína recombinante GST-ΔN7118L1, tanto en PBS como en urea. En ambos casos aparecieron al menos dos bandas de alrededor de 85-90 KDa. De éstas, la banda inferior correspondiente a la proteína en PBS fue la única reconocida por el anticuerpo anti-GST (banda de color pardo superpuesta a la banda morada detectada por la diferencia de sustrato en el revelado), y la superior en el caso de la proteína en PBS+urea (Figura 4.25, A, B, A' y B'). La mezcla de plasmas de hemodonantes, sólo reconoció trazas de la proteína GST-ΔN7118L1 en urea y el cóctel IH8 sólo la proteína GST-ΔN7118L1. Ambas muestras humanas reconocieron además una banda intensa de aproximadamente 60 KDa, que no fue detectada por ninguno de los anticuerpos comerciales, que podría corresponder a alguna proteína de *E. coli* que coprecipitó con nuestra proteína de fusión (como es el caso de la chaperona GroEL). Esta banda, no apareció en el caso de la proteína GST-ΔN7118L1 eluida en urea.

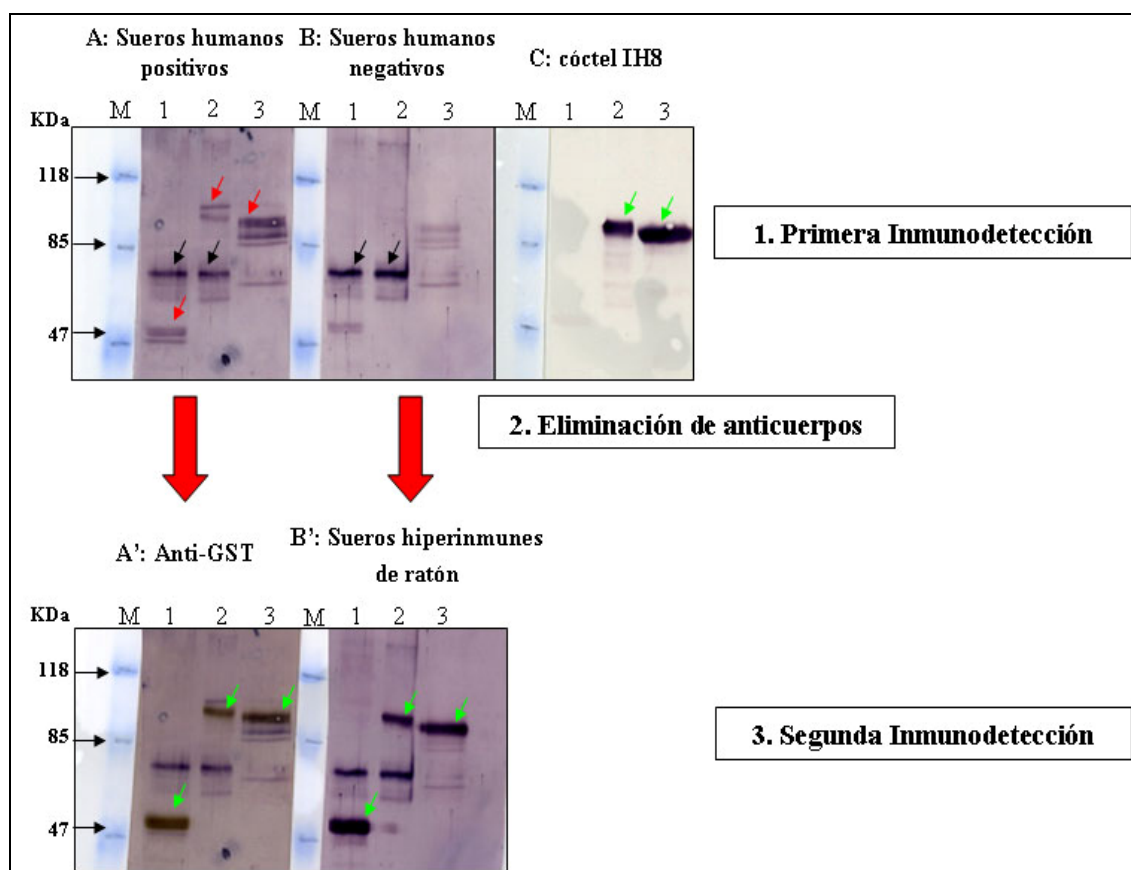


Figura 4.25: Doble inmunodetección de proteínas. Membrana A: primera inmunodetección con sueros humanos positivos (1/50); A': segunda inmunodetección con anti-GST. Membrana B: primera inmunodetección con sueros humanos negativos (1/50); B': segunda inmunodetección con sueros hiperinmunes de ratón (1/50). Membrana C: inmunodetección con el cóctel IH8. Calles 1: GST-18L1Ct, 2: GST-ΔN7118L1 purificada por cromatografía y posterior electroelución en PBS, 3: GST-ΔN7118L1 purificada por cromatografía y posterior elución en PBS/urea. M: marcador de peso molecular. Las flechas rojas indican las proteínas de fusión y las negras una proteína de 60KDa, posiblemente la chaperona GroEL. Las flechas verdes indican las bandas detectadas por los anticuerpos comerciales en cada caso.

b) Caracterización mediante la técnica de ELISA

Dado que los anticuerpos anti-VPH comerciales empleados en este trabajo, así como los sueros humanos y comerciales, no reconocieron la proteína recombinante GST-18L1Ct y sí la proteína completa GST-ΔN7118L1, los siguientes ensayos se realizaron sólo con esta última.

Con objeto de determinar si las proteínas recombinantes podían presentar epítopos conformacionales que fuesen reconocidos por sueros humanos en ELISA, se desarrollaron inmunodetecciones, empleando la proteína GST-ΔN7118L1 electroeluida en PBS, o en PBS/urea. En el primer caso la proteína contendría trazas de detergentes (presentes en el tampón de proteínas en el que se desarrolla la electroelución), que pueden ser eliminadas al dializar la proteína frente a PBS. En el segundo caso, la

proteína contendría urea. Al realizar las diluciones de los antígenos en el tampón de sensibilización, los detergentes del tampón de proteínas y la urea se diluyen del orden de 50-100 veces, quedando la urea en concreto a una concentración de 0,07 a 0,03 mM, de forma que probablemente la proteína podría adquirir estructuras al menos secundarias. Se desarrollaron así diversos ensayos en los que se emplearon inicialmente, y como controles positivos los siguientes sueros animales: sueros hiperinmunes obtenidos en ratón, cóctel IH8 y anti-GST; y como controles negativos, los sueros preinmunes de ratón. Además se analizaron 17 sueros de pacientes caracterizados genéticamente como infectados con al menos VPH18 (apartado 3.1.5).

En primer lugar se determinó la cantidad de antígeno recombinante a emplear en los ensayos. En el caso de la proteína GST- Δ N7118L1, electroeluida en PBS, para todos los sueros animales se produjo un incremento de la medida de la absorbancia a 492 nm según aumentaba la concentración de antígeno en los pocillos (Figura 4.26, A), lo que indicó la existencia de un reconocimiento específico en todos los casos. En el caso de los sueros hiperinmunes de ratón el cambio de pendiente se produce a partir de los 50 ng de proteína por pocillo, si bien la absorbancia sigue aumentando, no alcanzándose el máximo con concentraciones de 5 μ g/ml (500 ng de proteína total por pocillo). En cuanto al cóctel IH8, la pendiente disminuye claramente a partir de los 100 ng por pocillo. Sin embargo, para el anticuerpo Anti-GST, el máximo de absorbancia se alcanzó ya a una concentración de 0,5 μ g/ml (50 ng de proteína total en el pocillo). De esto podríamos deducir que, para futuros ensayos, la concentración de antígeno debería situarse en un mínimo de 100-200 ng/ pocillo, sin alcanzar los 500 ng.

Cuando los ensayos se realizaron con la proteína eluida en PBS/urea, también se observó un incremento de la medida de la absorbancia a 492 nm según aumentaba la concentración de antígeno en los pocillos, existiendo por tanto reconocimiento específico (Figura 4.26, B). La respuesta de los sueros animales, frente al antígeno diluido en urea, es similar a la observada cuando la proteína es purificada en PBS, si bien la pendiente es algo superior, por lo que la concentración final de antígeno a emplear quizá debiera ser superior a los 100 ng por pocillo determinados para el antígeno purificado en PBS, situándose en torno a los 500 ng.

Se calcularon los ratios para los sueros hiperinmunes de ratón, así como para el cóctel IH8, empleando los valores de absorbancia obtenidos para los sueros preinmunes en cada caso, (valores siempre inferiores a 0,1) ya que la mezcla de anticuerpos IH8 también está desarrollada en ratón (Tabla 4.1).

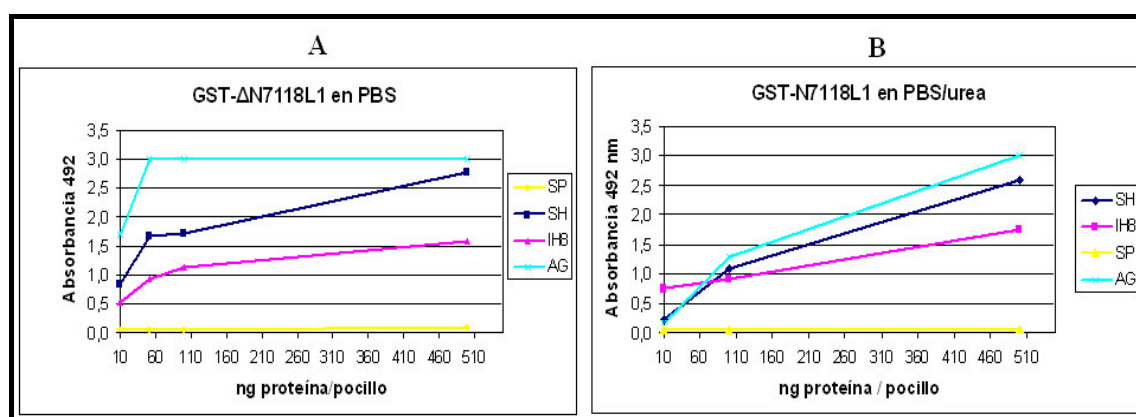


Figura 4.26. Gráficas de análisis de respuesta de los sueros animales a concentraciones crecientes de la proteína GST-ΔN7118L1 **(A)** Proteína eluida en PBS. **(B)** Proteína eluida en PBS/Urea. SH: sueros hiperinmunes de ratón (1/100), SP: sueros preinmunes de ratón (1/100), IH8: cóctel IH8 (1/80), AG: anti-GST (1:3000).

GST-ΔN7118L1 (ng/pocillo)	Sueros hiperinmunes de ratón		Cóctel IH8	
	PBS	PBS/urea	PBS	PBS/urea
500	31,00	35,16	17,57	23,74
100	33,08	26,94	21,60	22,49
50	43,61	N.A.	24,05	N.A.
10	13,20	7,51	8,33	23,17

Tabla 4.1. Ratios obtenidos en los ensayos de ELISA para los sueros de ratón hiperinmunes y para el cóctel IH8, empleando distintas cantidades de la proteína de fusión purificada en PBS o en PBS/urea. N.A.: no analizado.

Para el análisis de los resultados obtenidos con los sueros de pacientes, se trabajó con las medias de las absorbancias de los 17 sueros humanos empleados, siendo la desviación estándar inferior a 0,7 en todos los casos. Para ambos antígenos (proteína purificada en PBS y en PBS/urea) también se observó que a medida que aumentaba la concentración de antígeno por pocillo, aumentaban los valores de absorbancia, produciéndose una clara disminución de la pendiente a los 100 ng por pocillo, siendo a partir de este momento menor (Figura 4.27). De todo esto pudimos concluir que en futuros ensayos se empleará una concentración de proteína GST-ΔN7118L1 de 100 a 500 ng/pocillo.

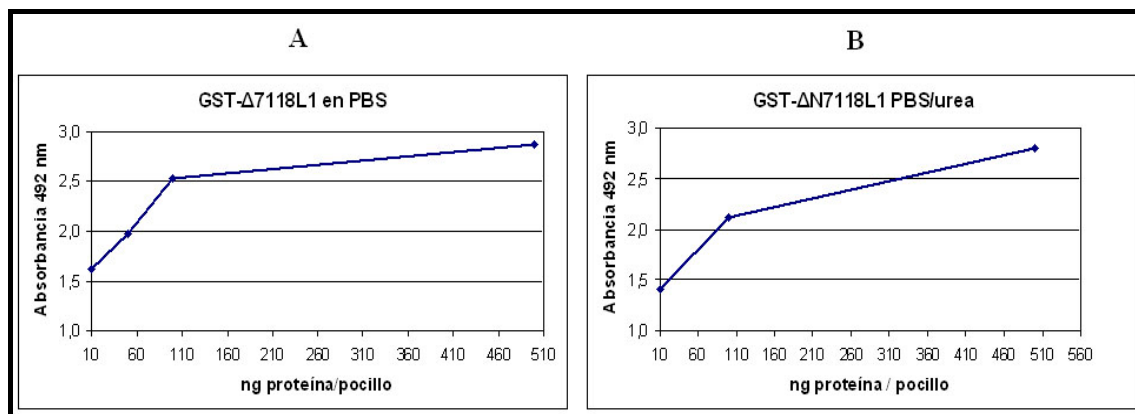


Figura 4.27: Gráficas de análisis de respuesta de los sueros humanos, a concentraciones crecientes de la proteína GST-ΔN7118L1 (A) Proteína eluida en PBS. (B) Proteína eluida en PBS/urea.

A continuación se seleccionaron tres plasmas humanos procedentes de hemodonantes sanos (HD6, HD7 y HD9) y un suero de paciente caracterizado genéticamente como no infectado por VPH de alto riesgo (GN5). Estos sueros fueron denominados sueros negativos. Por otro lado se seleccionaron 5 sueros de pacientes caracterizados genéticamente como infectados por VPH al menos tipo 18 (GP4, 5, 6, 7 y 8), que fueron denominados sueros positivos.

Estos sueros se enfrentaron a la proteína recombinante GST-ΔN7118L1 purificada en PBS y en PBS/urea. Los pocillos, se sensibilizaron con 300 ng de proteína. El punto de corte obtenido en el ensayo fue de 0,582 en el caso de la proteína purificada en PBS, y de 0,392 en el caso de la proteína purificada en PBS/urea, con ratios de 1,81 y 2,2 respectivamente, sin considerar el resultado obtenido para el suero negativo GN5 que presentaba valores de absorbancia muy elevados (Figura 4.28).

Estos mismos sueros se enfrentaron a las VLPs de VPH18 (consideradas patrones de referencia) producidas en las células de insecto (apartado 4.3), y respondieron de manera semejante (Figura 4.29). Las VLPs se emplearon a la misma concentración (300 ng/pocillo), aplicándose el mismo protocolo de ELISA que en el caso anterior, si bien el ratio fue de tan sólo 0,47. El valor de corte obtenido fue de 0,393.

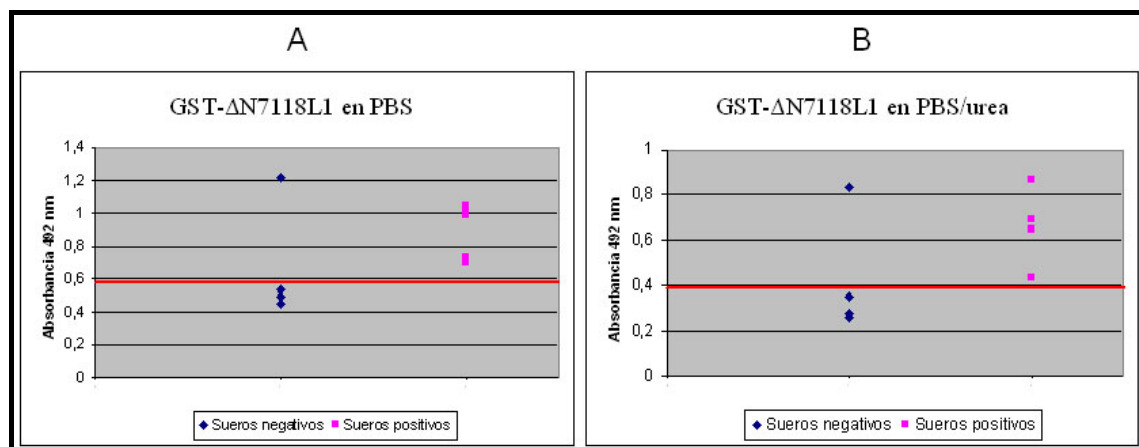


Figura 4.28. Valoración en sistema de ELISA de sueros humanos negativos y positivos, empleando la proteína GST-ΔN7118L1 purificada en PBS y en PBS/urea a concentración de 300 ng/pocillo. La línea roja marca el valor de corte obtenido en cada ensayo.

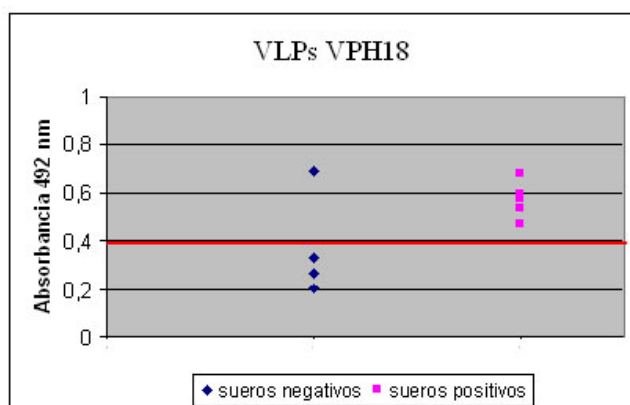


Figura 4.29. Valoración en sistema de ELISA de sueros humanos negativos y positivos, empleando VLPs a concentración de 300 ng/pocillo. La línea roja marca el valor de corte obtenido en el ensayo.

4.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE L1 DE VPH18 EN *Pichia pastoris*

La expresión de proteínas recombinantes en el sistema basado en la levadura *P. pastoris*, bajo el promotor del gen *aox1* inducible por metanol, se diseñó siguiendo dos aproximaciones:

1. Expresión de la proteína L1 de VPH18 como proteína de secreción. Para ello se emplearon los vectores pPICZ α , en los que la proteína quedaría fusionada a la señal de secreción del factor α en el extremo N-terminal, y al epítipo *c-myc* en el extremo C-terminal, con objeto de facilitar su posterior identificación mediante el uso de anticuerpos anti-*myc* (construcción **18L1Z α**). Esta construcción generaría una proteína de 595 aminoácidos, 66,7 KDa, y un pI de 7,7 y sería secretada al medio en el que se llevaría a cabo la inducción del cultivo.
2. Expresión de la proteína L1 de VPH18 en forma nativa para la posterior purificación de VLPs. Para ello se emplearon los vectores pPICZ. En este caso se prepararon dos construcciones clonándose la secuencia completa para dicha proteína, desde el primer ATG (construcción **18VLPZ**) o desde el tercer ATG (construcción **Δ N6118VLPZ**). La construcción 18VLPZ generaría una proteína de 568 aminoácidos y 63,6 KDa, con un pI de 8,1. La construcción Δ N6118VLPZ generaría una proteína de 507 aminoácidos, con un peso molecular de 56 KDa y un pI de 7,8.

El esquema completo seguido para la obtención de las proteínas recombinantes se muestra en la Figura 4.30. De forma resumida, los productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos seleccionados fueron clonados en el vector pCR-2.1 TOPO, empleándose el vector recombinante como molde para la amplificación con nuevos cebadores, diseñados especialmente para el clonaje de la región L1 completa (con el entorno del ATG modificado) en los vectores pPICZ y pPICZ α , que darían lugar a las construcciones 18VLPZ y 18L1Z α . El producto de PCR (obtenido en la amplificación de L1 desde el tercer ATG del ORF), se clonó también en el vector pPICZ para originar la construcción Δ N6118VLPZ. Los plásmidos recombinantes linealizados fueron empleados para transformar las distintas cepas de levaduras mediante electroporación. El proceso se detallará a continuación.

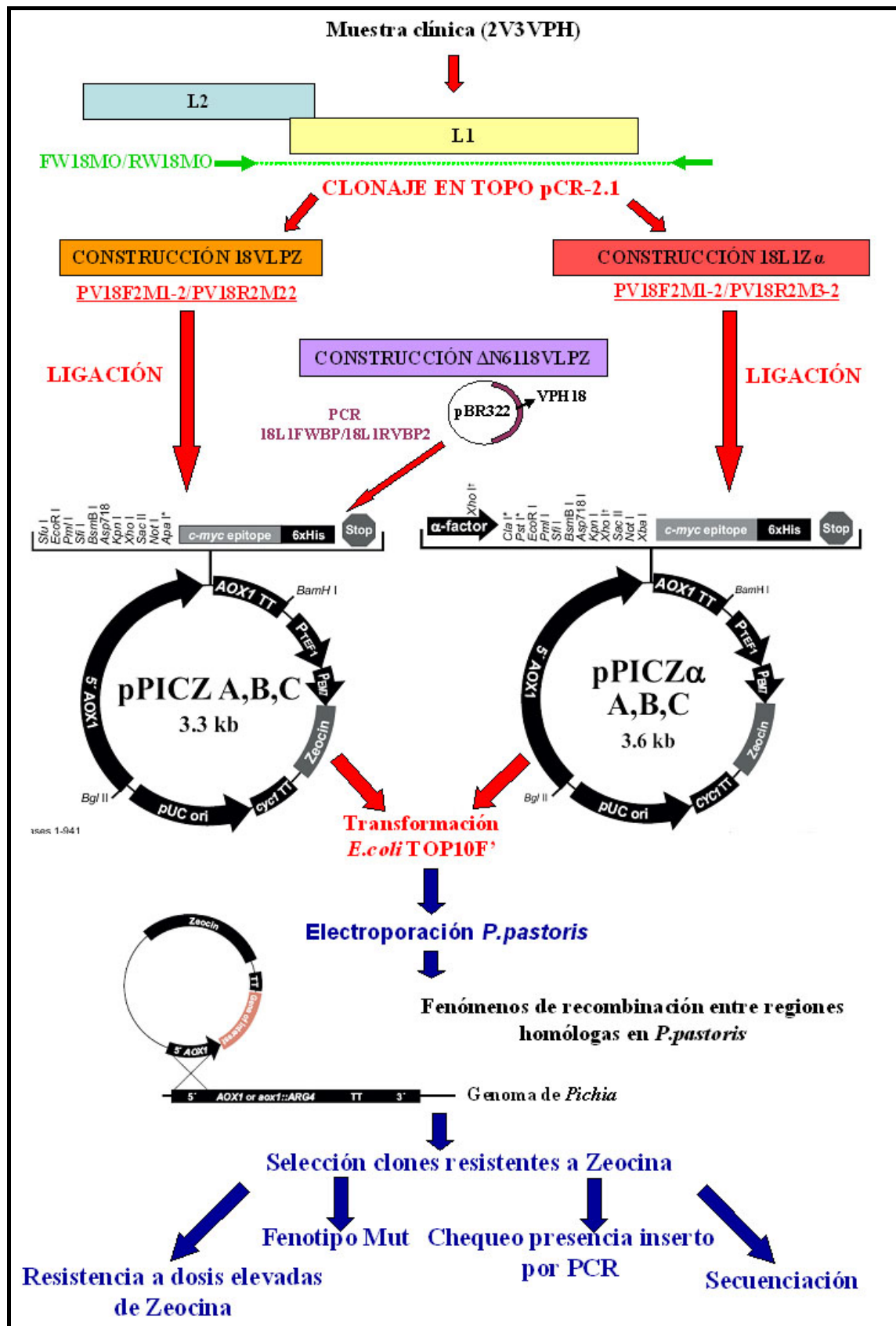


Figura 4.30. Esquema de pasos para la obtención de clones de levaduras recombinantes (construcciones 18VLPZ, 18L1Z α , Δ N6118VLPZ). Los procesos señalados en color rojo son los que se realizan en bacterias, y los de color azul los que se desarrollan en levaduras.

4.2.1 Amplificación de la región L1 de VPH18

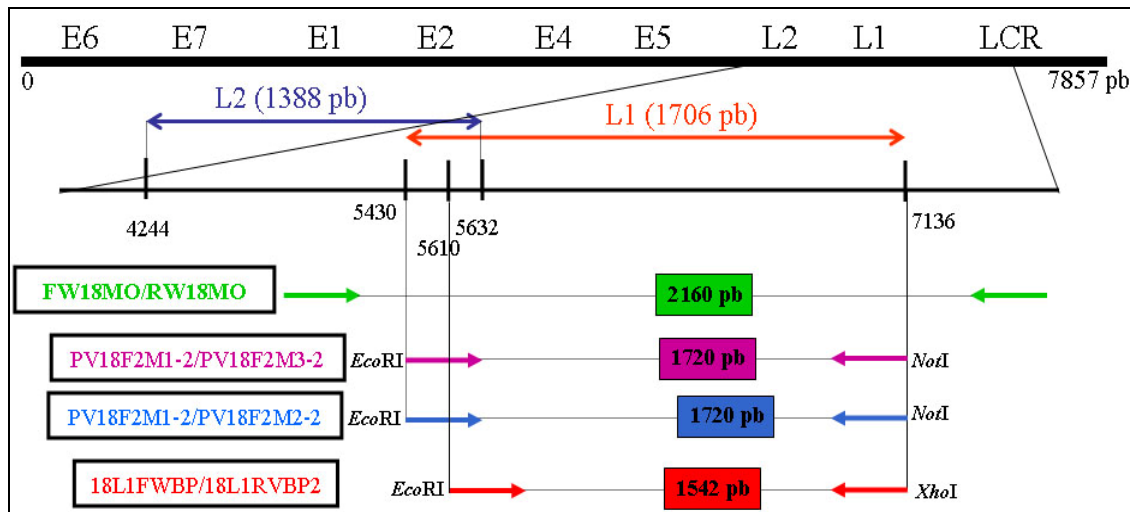


Figura 4.31. Esquema de las parejas de oligonucleótidos empleados para la obtención de secuencias de ADN para la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*.

a) Construcción 18L1Zα: proteína recombinante de secreción

Para amplificar la región L1 de VPH18 para su expresión como proteína de secreción, se partió del producto de amplificación de 2160 pb (cebadores 18L1FWMO/18L1RVMO) obtenido a partir de una muestra clínica (2V3VPH) y clonado en el vector pCR-2.1 TOPO, previamente empleado para obtener las construcciones en bacterias (Figura 4.31).

Utilizando como molde dicho ADN plasmídico, se realizó la amplificación de la región L1 completa empleando los oligonucleótidos PV18F2M1-2/PV18R2M3-2 (Figura 4.31, Tabla 3.4), que contienen las dianas de restricción *EcoRI* y *NotI* respectivamente, junto con sus secuencias de apoyo, con objeto de realizar una clonación dirigida en el vector de expresión pPICZα (Figura 4.30). Además, el oligonucleótido reverso contenía una mutación en la secuencia silvestre del gen L1 que provocaría la desaparición del codón de parada original, permitiendo así la fusión de la proteína con el epítipo *c-myc*, en su extremo C-terminal. Aunque inicialmente se emplearon diversas polimerasas y temperaturas de hibridación, no se obtuvo amplificación, probablemente debido a la diferencia en las T_m entre ambos cebadores (59,2 y 78,2°C respectivamente), por la incorporación de dianas en el oligonucleótido reverso, con alto contenido en G+C. Finalmente la amplificación se realizó en una PCR en dos fases, adicionando el oligonucleótido reverso tras los primeros veinte ciclos de

amplificación e incrementando la temperatura de hibridación durante un número equivalente de ciclos (Tabla 3.6). Se obtuvo así un fragmento de 1720 pb (Figura 4.32).

b) Construcciones 18VLPZ y Δ N6118VLPZ: proteínas nativas

Para amplificar la región L1 de VPH18 para su expresión como proteína nativa, se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos para cada una de las construcciones. La amplificación a partir del primer ATG, correspondiente a la construcción 18VLPZ se realizó con la pareja de oligonucleótidos PV18F2M1-2/PV18R2M2-2, conteniendo las dianas *EcoRI/NotI* respectivamente, junto con sus secuencias de apoyo (Tabla 3.4), para realizar una clonación dirigida en el vector pPICZ. Al cebador directo se le introdujeron modificaciones en el entorno del ATG para adecuarlo a la secuencia Kozak de levaduras que ayuda al reconocimiento del inicio de traducción (Figura 4.33). Las amplificaciones se realizaron empleando el mismo ADN molde que en el caso anterior y las mismas condiciones de amplificación (Tabla 3.6). Tras el análisis en agarosa de los productos de PCR, se obtuvo un fragmento de 1720 pb (Figura 4.32).

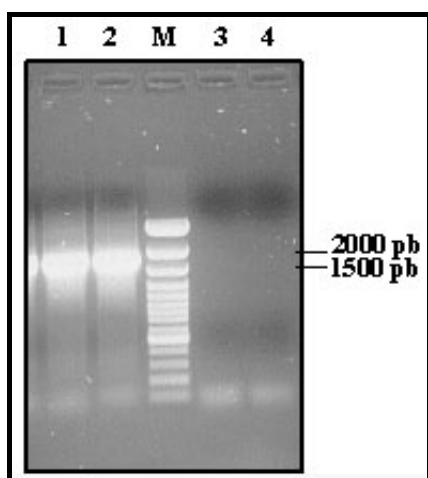


Figura 4.32. Agarosa 1%, en la que se muestran los amplicones de PCR generados para obtener las construcciones 18L1Z α (1) y 18VLPZ (2) con sus respectivos controles negativos (3 y 4). M: marcador de peso molecular.

Para la tercera construcción (Δ N6118VLPZ) se empleó el amplicón de PCR obtenido para la expresión de VLPs en el sistema basado en baculovirus recombinantes (apartado 4.3.1). Se utilizó la pareja de cebadores 18L1FWBP/18L1RVBP2 (Tabla 3.4), diseñados sobre la región L1 de VPH18, para amplificarla a partir del tercer ATG. La amplificación se desarrolló empleando como ADN molde el plásmido pBR322 de la ATCC que contiene el genoma completo de VPH18. Tras la amplificación se obtuvo un producto de 1542 pb (Figura 4.42)

4.2.2 Clonación en vectores pPICZ y pPICZ α

Para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris* se emplearon los vectores pPICZ y pPICZ α (Figura 4.30). Los vectores y los productos de PCR fueron adecuadamente digeridos con las endonucleasas de restricción *EcoRI/NotI*, para las construcciones 18L1Z α y 18VLPZ, y *EcoRI/XhoI* para la construcción Δ N6118VLPZ.

a) Clonación en vectores pPICZ α para expresión de la proteína como proteína de secreción (construcción 18L1Z α)

El producto de amplificación generado con los cebadores PV18F2M1-2/ PV18R2M3-2 se clonó en el vector pPICZ α B, donde la secuencia L1 entraba en marco de lectura con la señal de secreción y con el epítipo *c-myc*. Con los productos de ligación se transformaron células de *E. coli* TOP10F', seleccionándose los clones recombinantes resistentes a zeocina a partir de los cuales se realizó un aislamiento de ADN plasmídico para utilizar en la transformación de levaduras, una vez realizada la secuenciación de las construcciones.

b) Clonación en vectores pPICZ para producción de VLPs (construcciones 18VLPZ y Δ N6118VLPZ)

b.1) Construcción 18VLPZ

Igual que en el caso anterior, el producto de PCR generado con los oligonucleóticos PV18F2M1-2/ PV18R2M2-2 se clonó en el vector pPICZB. En este caso, el marco de lectura no era importante, puesto que la secuencia no se iba a fusionar con ningún elemento del vector, de forma que contenía su propio ATG de inicio y su propio codón de parada. Con los productos de ligación se transformaron células de *E. coli* TOP10F' y se seleccionaron varios clones recombinantes resistentes a zeocina. A continuación se realizaron aislamientos de ADN plasmídico para transformar las levaduras.

b.2) Construcción Δ N6118VLPZ

En el caso de la construcción delecionada en el extremo N-terminal, no se realizaron modificaciones del entorno ATG. Así, el producto de PCR generado con los oligonucleótidos 18L1FWBP/18L1RVBP2 se clonó en el vector pPICZC. El producto de la ligación se empleó para transformar células de *E. coli* TOP10F', seleccionándose

clones resistentes a zeocina a partir de los cuales se realizaron aislamientos de ADN plasmídico para la posterior transformación de las levaduras mediante electroporación.

4.2.3 Comprobación de la identidad de las secuencias

Para comprobar la integridad de las secuencias de las tres construcciones, así como que la construcción 18L1Z α se encontraba en el marco de lectura correcto, se llevó a cabo la secuenciación de los plásmidos empleando los oligonucleótidos comerciales 5'AOX1 y 3'AOX1 diseñados sobre los vectores, así como los cebadores MY09, 18L1FWn y 18L1F600, 18L1F700 y 18L1F800, diseñados sobre la región L1 (Figura 3.1). Se corroboró la integridad de la secuencia para las tres construcciones, así como la incorporación de las mutaciones dirigidas en el entorno del ATG en las construcciones en las que se usaron los cebadores directos con esta intención. En cuanto a la construcción 18L1Z α , se comprobó que se encontraba en el mismo marco de lectura que la señal de secreción y que el epítipo *c-myc*, habiéndose eliminado el codón de parada de la secuencia nativa de L1. Para la construcción 18VLPZ, se observó una delección de la tercera adenina del codón de parada de la secuencia de L1, sin embargo el codón se recuperó en la misma posición, gracias a la primera base del oligonucleótido que contiene la diana *NotI*, sustituyéndose así el codón de parada TAA por el codón de parada TAG (Figura 4.33).

En las secuencias correspondientes a las construcciones 18L1Z α y 18VLPZ, procedentes de la muestra clínica 2V3VPH, se detectaron cuatro bases diferentes con respecto a la secuencia seleccionada como prototipo (X05015) descrita anteriormente (ver Anexo 1). Dos de estas bases diferentes, localizadas en las posiciones 446 y 972 del alineamiento, son las mismas que las descritas para la construcción GST- Δ N7118L1 de bacterias, lo cual es lógico puesto que ambas secuencias de ADN se han obtenido a partir de la misma muestra clínica. Las otras dos, localizadas en las posiciones 74 y 190 (en la región delecionada en bacterias), también han sido descritas en clones pertenecientes a la variante europea de VPH18. Las diferencias entre el prototipo y la variante europea y las modificaciones en el entorno del ATG realizadas en las construcciones 18VLPZ y 18L1Z α generan diferencias aminoacídicas en posiciones 2, 25, 64 y 149 (ver Anexo 1).

En la secuencia correspondiente a la construcción delecionada (Δ N6118VLPZ), obtenida a partir del ADN de VPH18 contenido en el vector comercial, no se detectó ningún cambio con respecto al prototipo (X05015).

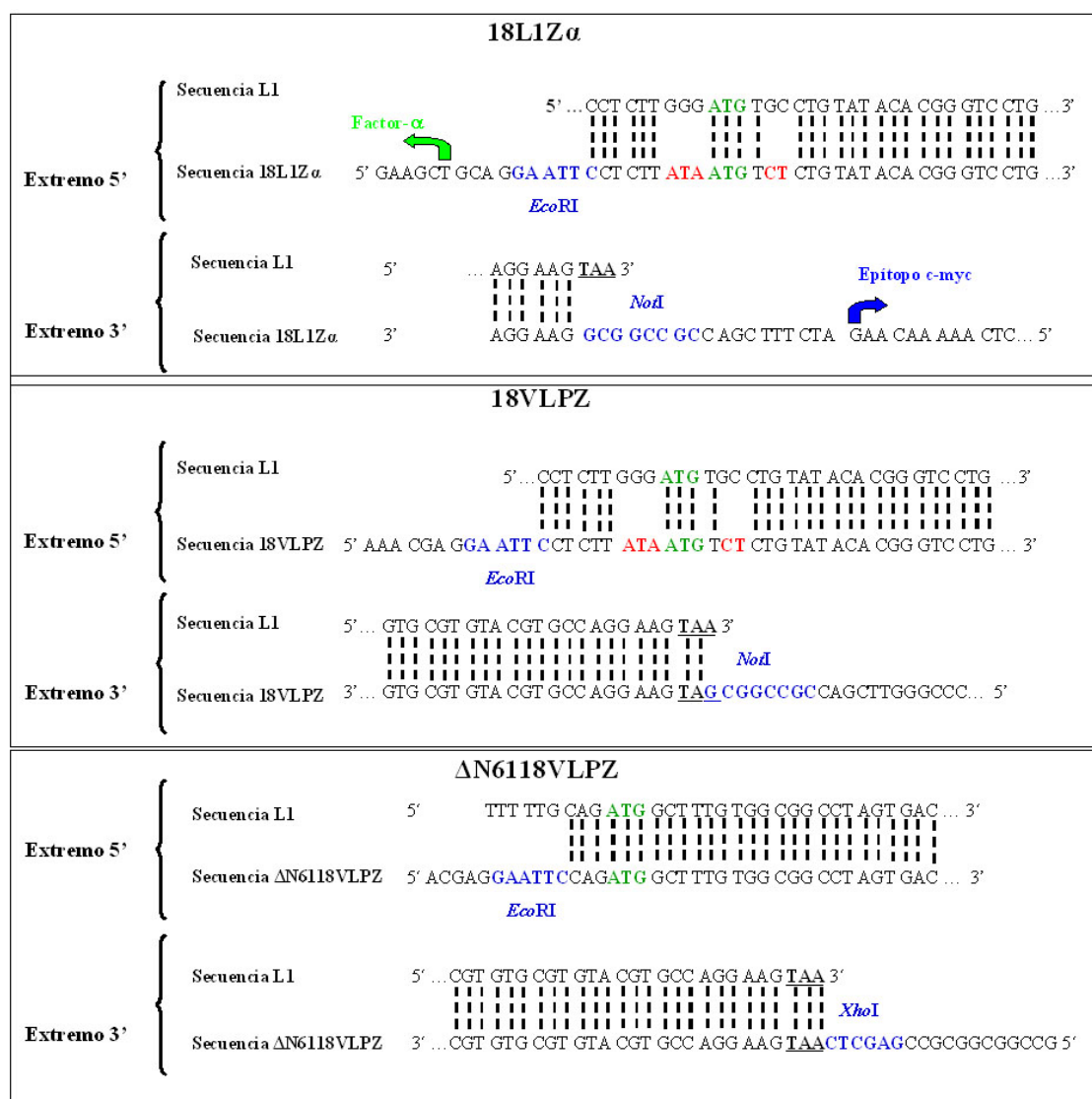


Figura 4.33. Esquema de las secuencias correspondientes a los extremos 3' y 5' de las construcciones generadas para transformación de levaduras: 18L1Zα, 18VLPZ y ΔN6118VLPZ. En verde, los codones de inicio. En negrita y subrayados, los codones de parada. En rojo las modificaciones del entorno ATG. En azul las dianas de enzimas restricción. En la construcción 18L1Zα se señala el marco de lectura de la señal de secreción del factor α y del epítipo c-myc.

4.2.4 Obtención de clones recombinantes en *P. pastoris*

Comprobada la integridad de las construcciones en *E. coli*, éstas fueron empleadas para transformar levaduras mediante electroporación (apartado 3.2.11.2). Tras la siembra en placas de YPDS+Zeocina se obtuvieron, para la construcción 18VLPZ, ocho clones en la cepa X-33 y cuatro clones en la cepa KM71H. Para la construcción 18L1Zα, veintún clones en la cepa X-33 y once en la cepa KM71H. Para la construcción delecionada se transformó sólo la cepa X-33, obteniéndose un total de dieciséis clones recombinantes.

Además se realizaron transformaciones de ambas cepas, con los vectores (pPICZA y pPICZαB) linealizados, utilizados como controles negativos.

a) Comprobación del fenotipo Mut

A continuación se determinó el fenotipo de los clones recombinantes obtenidos en la cepa X-33, para las tres construcciones. Esta comprobación es necesaria debido a que, en caso de tener lugar fenómenos de recombinación doble entre las regiones homólogas del vector recombinante y del genoma de la levadura, se puede producir la sustitución (en lugar de integración) de la región AOX1 silvestre, por nuestro casete de expresión. Esto daría lugar a la interrupción del gen que codifica la alcohol oxidasa 1, llevando a la aparición del fenotipo Mut^s en clones recombinantes de la cepa X-33 (cuyo fenotipo original es Mut⁺). Por tanto, esta comprobación es necesaria sólo en el caso de la cepa X-33, porque en la cepa KM71H, aunque se den recombinaciones dobles, continuará presentando fenotipo Mut^s.

Así, los clones fueron resembrados en placas de medio MD (medio con glucosa) y MM (medio con metanol), manteniendo el mismo patrón en ambas. Cuando fueron comparados con el crecimiento en ambos medios de cepas tipo de fenotipos Mut⁺ y Mut^s, todos los clones recombinantes en la cepa X-33 en todas las construcciones parecieron presentar fenotipo silvestre Mut⁺ (Figura 4.34).

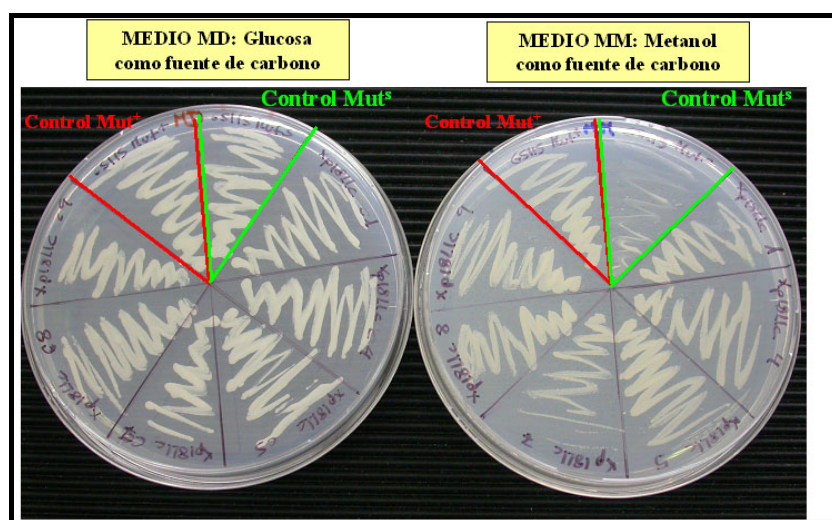


Figura 4.34. Comprobación del fenotipo Mut de los clones recombinantes obtenidos en la cepa X-33. El sector marcado en verde señala el control Mut^s de crecimiento pobre en medio MM. El sector rojo muestra la cepa Mut⁺, de crecimiento normal en ambos medios.

b) Análisis molecular de los clones recombinantes

El análisis molecular de todas las construcciones se realizó mediante amplificaciones por PCR sobre las colonias recombinantes. Para ello se emplearon los

oligonucleótidos AOXL1-7A y AOXL1-8 (Tabla 3.4), que amplifican un fragmento de 703 pb de la región L1, en los clones recombinantes de las construcciones 18L1Z α y 18VLPZ. Como controles se emplearon las cepas silvestres o las colonias transformadas con los vectores sin inserto (clones no recombinantes), no obteniéndose amplificación. Dado que para la construcción Δ N6118VLPZ no se pudo emplear el cebador directo AOXL1-7A, ya que está diseñado en la región amino-terminal delecionada en esta construcción, el análisis molecular se realizó con los oligonucleótidos 5'AOX1/AOXL1-8, que amplifican un fragmento de aproximadamente 635 pb (Figura 4.35).

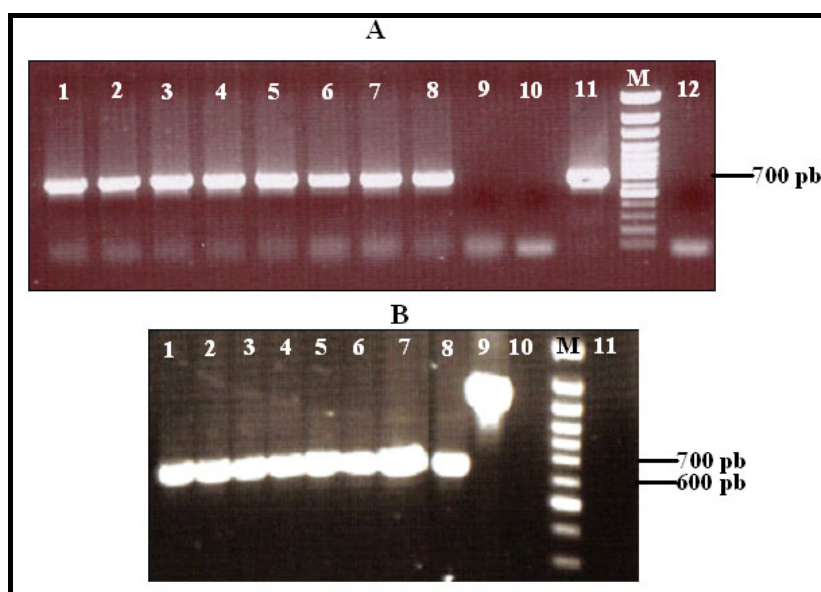


Figura 4.35. Análisis molecular de clones recombinantes de levaduras transformadas. (A) Amplificaciones con los cebadores AOXL1-7A/AOXL1-8 sobre las construcciones 18VLPZ y 18L1PZ α . Calles 1 a 8: clones recombinantes. Calle 9: clon no recombinante. Calle 10: cepa silvestre. Calle 11: control positivo (PCR sobre aislamiento de ADN plasmídico). Calle 12: control negativo de PCR. (B) Amplificaciones con los cebadores 5'AOX1/ AOXL1-8 sobre la construcción Δ N6118VLPZ. Calles 1 a 8 clones recombinantes. Calle 9: control positivo de ADN, construcción 18L1Z α (producto de 1050 pb). Calle 10: cepa silvestre. Calle 11: control negativo de PCR. M: marcador de tamaño molecular.

Se realizó además la secuenciación de los amplicones obtenidos, con objeto de comprobar la especificidad de los productos amplificados, escogiéndose para ello al menos dos clones de cada una de las construcciones que presentaban resistencia a elevadas concentraciones de zeocina (ver siguiente apartado).

c) Análisis de la resistencia a dosis elevadas de zeocina

Con el objeto de detectar posibles clones recombinantes multicopia (que hubiesen integrado múltiples copias del casete de expresión), y que por tanto pudieran

expresar la proteína recombinante en mayores cantidades, los clones recombinantes se sembraron en placas de YPDS con concentraciones crecientes de zeocina. En la Tabla 4.2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

Construcción	Cepa	Zeocina (µg/ml)				
		100 ¹	300	500	1000	2000
18VLPZ	X-33	8 clones	3 clones	1 clon	N.A.	N.A.
	KM71H	4 clones	3 clones	3 clones	N.A.	N.A.
ΔN6118VLPZ	X-33	16 clones	N.A.	16 clones	15 clones	12 clones
18L1Zα	X-33	22 clones	15 clones	7 clones	N.A.	N.A.
	KM71H	11 clones	5 clones	2 clones	N.A.	N.A.

Tabla 4.2. Análisis de los clones resistentes a concentraciones crecientes de zeocina, en cada una de las construcciones generadas. N.A.: no analizado. 1: representa el número total de clones ya que es la concentración utilizada para la selección inicial de transformantes.

4.2.5 Ensayos de expresión de la proteína como proteína de secreción (construcción 18L1Zα)

Esta construcción fue generada con objeto de que la proteína L1 quedase fusionada en su extremo N-terminal a una señal de secreción, con lo que una vez procesada, debería aparecer en el medio de inducción de las levaduras.

Se indujeron 16 clones recombinantes obtenidos en ambas cepas de *P. pastoris*, tanto en la cepa X-33 como en la cepa KM71H, según se describe en el apartado 3.2.14.2. Las inducciones se realizaron en medio BMMY, medio complejo y tamponado, con objeto de que las proteínas secretadas no fueran liberadas en un medio con pH excesivamente ácido o básico. Las concentraciones de metanol ensayadas fueron de 0,5; 1 y 2%. En este caso se trabajó con dos cepas control descritas en el apartado 3.1.2):

- . Cepa GS115/Albúmina: que secreta al medio albúmina (67 KDa) a concentraciones superiores a 1 g/L.
- . Cepa GS115/pPICZ/LacZ: se trata de un control de expresión intracelular que produce β-galactosidasa.

Tras el análisis en SDS-PAGE de los sobrenadantes de alícuotas de cultivos de clones recombinantes inducidos, no se detectó ninguna banda que pudiera corresponder con nuestra proteína de fusión, y sólo en contadas ocasiones, aparecieron bandas muy tenues, de tamaños mayores, que luego no fueron detectadas en ensayos de inmunodetección mediante WB con el anticuerpo anti-*myc* (Figuras 4.36), ni con el cóctel IH8 (resultado no mostrado). Sin embargo, cuando se realizó la inducción de la

cepa GS115/Albúmina, en las mismas condiciones en las que se indujeron nuestros clones recombinantes y en el mismo ensayo, se observó una banda de 67 KDa correspondiente a la albúmina en los sobrenadantes del cultivo, en SDS-PAGE (Figura 4.36, A). Además, por si la proteína no se hubiese secretado, a pesar de fusionarse a la señal de secreción, se analizaron los lisados celulares, obtenidos mediante ruptura mecánica con perlas de vidrio en Tampón de ruptura I (Tabla 3.1). Al mismo tiempo se indujo un clon de la cepa control GS115/pPICZ/LacZ, sometiéndose al mismo protocolo de lisis. Tras el análisis en WB con el anticuerpo anti-*myc*, se detectó una banda de 119 KDa, correspondiente a la proteína β -galactosidasa fusionada con el epítipo c-*myc* en el extremo C-terminal en los lisados de la cepa control, y no se detectó ninguna banda en los lisados de los clones de la construcción 18L1Z α (Figura 4.36, B). El uso de las cepas control en los ensayos demostró que, las condiciones de inducción (inducción a pequeña escala en medio BMMY) y las condiciones de lisis empleadas (lisis mecánica con perlas de vidrio en Tampón de ruptura I) permitían la expresión de proteínas de secreción así como la detección de proteínas recombinantes expresadas intracelularmente fusionadas al epítipo c-*myc*, empleando la técnica de WB. Tampoco en WB con sueros hiperinmunes de ratón, ni con el cóctel IH8 (resultados no mostrados) se detectó ninguna banda que pudiese corresponder con la proteína de fusión de L1 de VPH18.

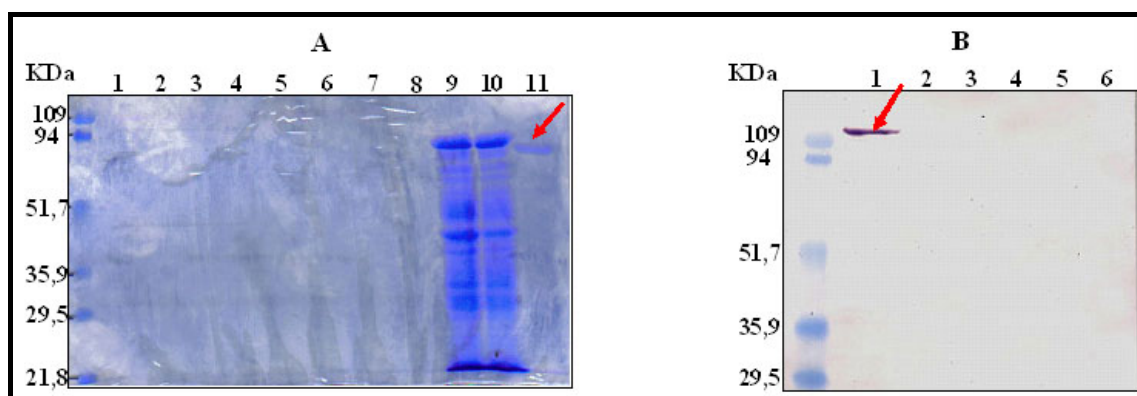


Figura 4.36. Análisis de sobrenadantes y lisados de clones recombinantes para la construcción 18L1Z α en la cepa X-33 (inducción con metanol 0,5%) **(A)** SDS-PAGE de tres clones recombinantes diferentes y un control negativo de expresión transformado sólo con el vector. Calles **1 a 3**: sobrenadantes de 48 horas de inducción; **4**: sobrenadante de control de 48 horas de inducción; **5 a 7**: sobrenadantes de 56 horas de inducción; **8**: sobrenadante control de 56 horas de inducción; **9**: lisado de células recombinantes (56 horas); **10**: lisado de clon no recombinante (56 horas); **11**: sobrenadante de inducción de la cepa GS115/Albúmina (70 horas). La flecha roja indica la banda correspondiente a la albúmina secretada al medio. **(B)** Immunodetección con anticuerpo anti-*myc*. Calle 1: control positivo GS115/LacZ 48 h de inducción. Calles 2 a 6: sobrenadantes de clones recombinantes de la cepa X-33 **2**: clon 12 24 h de inducción, **3** y **4**: clones 1 y 5 48 h de inducción **5** y **6**: clones 1 y 55 h de inducción respectivamente.

4.2.6 Ensayos de expresión de proteínas en forma nativa para purificación de VLPs

a) Construcción 18VLPZ

Se realizaron varias inducciones de 7 clones recombinantes obtenidos en ambas cepas de levaduras (X-33 y KM71H), con metanol al 0,5 ó 1%. En los análisis por SDS-PAGE de los sobrenadantes y de los lisados de los clones inducidos, no se observaron bandas diferentes a las de los controles, ni siquiera en tiempos avanzados para ninguna de las dos cepas. Sólo en uno de los clones de la cepa KM71H, se obtuvo una banda a la altura de 66 KDa a partir de las cinco horas de inducción (el tamaño de la proteína L1 completa es de 63 KDa), que después no fue reconocida en WB por sueros de ratón hiperinmunes (Figura 4.37) ni por el cóctel IH8 (resultado no mostrado). En el caso de la cepa X-33, tras el análisis por SDS-PAGE de los sobrenadantes y los lisados celulares, no se observó ninguna banda diferente a la de un control no recombinante (Figura 4.38, A) aunque en el lisado de una alícuota de uno de estos clones, tras cuatro horas de inducción, se detectaron mediante WB una serie de bandas entre 47 y 85 KDa (Figura 4.38, B). Sin embargo, los resultados no fueron reproducibles por lo que probablemente se trató de una reacción inespecífica o de un artefacto. Muchas de estas muestras fueron analizadas por microscopía electrónica y aunque se observaron formaciones de naturaleza proteica, no se correspondían con VLPs.

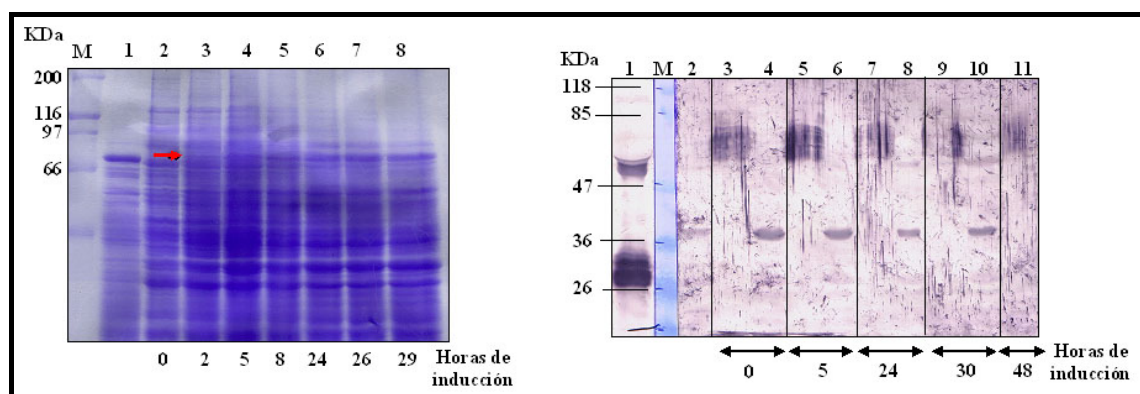


Figura 4.37. Análisis de inducciones con metanol al 0,5% de un clon de la construcción 18VLPZ en la cepa KM71H. (A) SDS-PAGE 10%. Calles 1: lisado de clon no recombinante (48 horas), 2 a 8: lisados de clon recombinante a diferentes horas de inducción mostradas en la base de la figura. La flecha roja indica una banda que aparece a partir de las 2 horas de inducción y que no aparece en el control. M: marcador de peso molecular no teñido. (B) Análisis por WB con sueros hiperinmunes de ratón (1/50) enfrentados a sobrenadantes de clon recombinante (calles 3, 5, 7 y 9) y lisados de clon recombinante (calles 4, 6, 8, 10 y 11) a diferentes horas de inducción, calle 1, suero completo de ratón (1/10); calle 2, control no recombinante de lisado (24 horas). M: marcador de peso molecular preteñido.

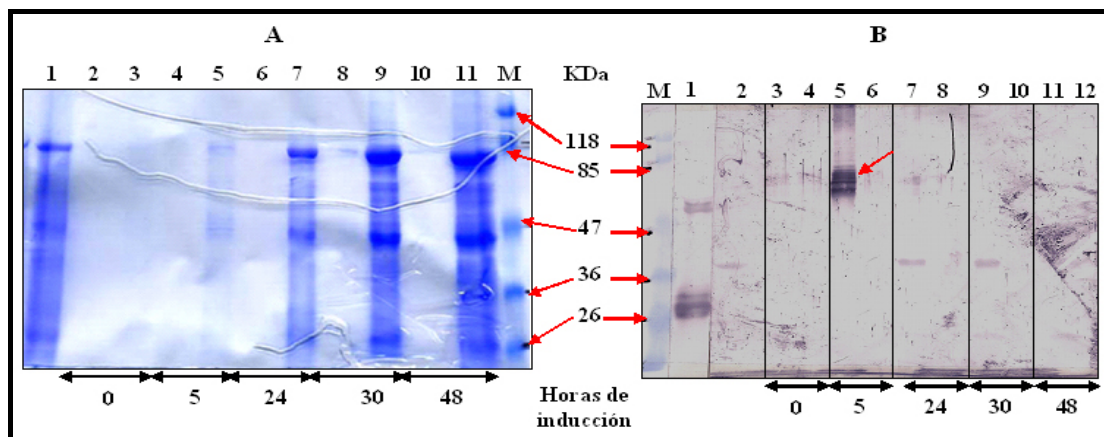


Figura 4.38. Análisis de inducciones con metanol 0,5% de un clon de la construcción 18VLPZ en la cepa X-33. (A) SDS-PAGE 10%. Calle 1: control negativo de expresión (30 horas). Calles 2, 4, 6, 8 y 10: alícuotas del sobrenadante del cultivo de un clon recombinante; calles 3, 5, 7, 9 y 11: alícuotas de lisado del clon recombinante inducido. (B) Análisis por WB con sueros hiperinmunes de ratón (1/50) enfrentados al mismo clon recombinante. Calle 1: suero ratón (1/10), Calle 2: lisado de control negativo de expresión tras 30 horas de inducción. Calles 3, 5, 7, 9 y 11: alícuotas de lisado del clon recombinante inducido. Calles 4, 6, 8, 10 y 12: alícuotas del sobrenadante del cultivo del clon recombinante. La flecha roja indica bandas reconocidas que no aparecen en el control. M: marcador de peso molecular.

Se probaron entonces nuevos métodos de ruptura, puesto que *Pichia* tiene una pared muy resistente, por si el nivel de ruptura celular alcanzado no era suficiente o por si la proteína no se estaba detectando por encontrarse en cuerpos de inclusión. Así se analizaron distintos métodos de lisis en distintos tampones (apartado 3.2.14.2), llevándose a cabo además, la separación y procesamiento posterior de la fracción no soluble en algunas de las muestras. Tras el análisis de los lisados y fracciones obtenidas, mediante microscopía electrónica, SDS-PAGE y/o WB, no se observaron ni VLPs ni bandas específicas que pudieran corresponder con la proteína de interés (Tabla 4.3).

Cepa	Tipo ruptura	Tampón ruptura	Solubilización fracción no soluble	Análisis
X-33	Perlas	Tampón II	-	M.E.
	Zimoliasa+ Glucanex	Tampón III	-	M.E.
	Sonicación	Tampón I	-	M.E.
			-	SDS-PAGE y WB sueros de ratón
	Liticasa	Tampón IV	-	SDS-PAGE y WB sueros de ratón
	Perlas	Tampón I	Tampón solubilización PTSD	SDS-PAGE y WB con IH8
KM71H	Homogenizador	Tampón II+ DTT 50 mM	-	M.E.
	Sonicación	Tampón I	-	M.E.

Tabla 4.3. Resumen de distintos métodos de lisis y procesamiento de células de cultivos inducidos para la construcción 18VLPZ, así como posteriores análisis de las proteínas de las mismas.

b) Construcción Δ N6118VLPZ

En este caso, se llevaron a cabo inducciones en erlenmeyer con metanol al 0,5 y 1% de cuatro clones recombinantes en la cepa X-33, empleando los medios MGY y MM, medios mínimos no tamponados, puesto que la proteína no se iba a secretar al medio. Las inducciones se desarrollaron durante 72-96 horas. Tras el análisis en SDS-PAGE de los lisados, obtenidos por diferentes métodos (Tabla 4.4), no se obtuvieron bandas diferentes respecto a los controles, que pudieran corresponder con nuestra proteína. Tampoco en WB empleando los sueros comerciales IH8 y HPV-4C4 (resultados no mostrados). En este caso, debido a que no se detectó ninguna banda mediante SDS-PAGE o WB, ninguna de las muestras de inducción se sometió a análisis mediante microscopia electrónica.

Finalmente, se seleccionó un clon, de entre los que presentaban resistencia a elevadas dosis de zeocina (clon Δ N6118VLPZ.6) y se realizó una inducción en fermentador (apartado 3.2.14.2), con objeto de controlar fundamentalmente la aireación, que parece crítica en los procesos de producción de proteína en la levadura. Al mismo tiempo en este tipo de cultivo se puede monitorizar también el pH, y la biomasa en cada momento. Además, permite alcanzar densidades celulares muy elevadas en el momento de adición de metanol, que pueden incrementar entre tres y cinco veces la iniciación de la transcripción a partir del promotor AOX1 (Cereghino & Cregg, 2000). Se empleó un modelo de fermentación en cultivo discontinuo alimentado (*fed-batch*) en el que en un primer período la levadura se cultiva en medio definido con una fuente de carbono como el glicerol, para acumular biomasa. En la segunda fase, se añade glicerol con un flujo de adición limitante para incrementar más aún la biomasa. Finalmente se produce la fase de inducción en la que se añade metanol inicialmente a un flujo lento para permitir la acomodación de las células al metanol, que después se incrementa hasta los niveles deseados (Cereghino *et al.*, 2002). La inyección de glicerol se inició a las 15 horas de cultivo, cuando la tasa de agitación alcanzó las 440 rpm. El glicerol se añadió durante 10 horas. Al final de esta fase, la biomasa celular alcanzada fue de 269,6 g/L. En este momento comenzó la inducción con metanol. Tras 50 horas de alimentación con metanol la biomasa alcanzada fue de 335 g/L, biomasa idéntica a la obtenida al final del proceso.

Las células recogidas del fermentador fueron sometidas a lisis mecánica o enzimática. Se llevó a cabo la separación de fracciones y la solubilización de la fracción no soluble (Tabla 4.4). Alícuotas de los lisados, y fracciones soluble y no soluble,

fueron analizadas mediante SDS-PAGE y WB, empleando los anticuerpos HPV-4C4 e IH8, sin observarse ninguna banda de interés (datos no mostrados), ni siquiera cuando las muestras de proteínas fueron concentradas mediante precipitación con etanol.

Metanol (%)	Condiciones de cultivo	N° clones	Tipo ruptura	Tampón ruptura	Solubilización
0,5 y 1%	Erlenmeyer	4	Mecánica: perlas vidrio	Tampón de ruptura I	No
					Tampón PTSD
<i>Fed Batch</i>	Fermentador	1	Mecánica: perlas vidrio	Tampón de ruptura II+DTT+glicerol	Tampón PTSD
					Tampón PSBM
			Liticasa+ perlas	Tampón de ruptura IV+Tampón de ruptura I	Tampón PTSD
					Tampón PSBM

Tabla 4.4. Resumen de distintos métodos de lisis y procesamiento de células de cultivos inducidos para la construcción ΔN6118VLPZ, así como posteriores análisis de las proteínas de las mismas.

4.2.7 Análisis de transcripción de los clones recombinantes

Dado que no se encontró expresión de proteína recombinante, en ninguno de los ensayos, y en ninguna de las construcciones, ni como proteína en forma nativa, ni como proteína de secreción fusionada al epítipo *c-myc*, se procedió a comprobar la existencia de transcripción específica, y sus niveles, mediante RT-PCR.

Para este estudio, se trabajó con un clon recombinante de cada construcción y en cada cepa. Se seleccionaron aquellos clones que habían sido inducidos, y en los que se había observado alguna banda en SDS-PAGE o WB. En caso de no tener ningún representante de este tipo, se seleccionaron clones de entre los que presentaban mayor resistencia a zeocina, y que ya habían sido sometidos a algún ensayo de expresión. Los cultivos para aislamiento de ARN total, se hicieron en medio BMMY tras inducción con metanol al 1% (clones de la cepa X-33) y al 0,5% (clones de la cepa KM71H). Todas las inducciones se realizaron en volúmenes de 25 ml de cultivo, en erlenmeyer de 250 ml, a 28°C durante un máximo de 72 horas. Además se realizó la inducción de un clon de la cepa X-33 transformado con el vector pPICZA, para utilizarlo como control.

Para la amplificación de los ADNc correspondientes a la región L1 se utilizaron los oligonucleótidos 18L1F600/AOXL1-8, que amplifican un fragmento de 120 pb. Además, se diseñaron cebadores que amplificasen un gen de expresión constitutiva de *P. pastoris*. Basándonos en trabajos anteriores (Ahn *et al.*, 2007), se diseñó una pareja

de cebadores sobre el gen que codifica el Factor de elongación de la transcripción 1- α (TEFW3/TEFRV3, Tabla 3.4), que amplifican un fragmento de 140 pb. Las condiciones aplicadas a la reacción de amplificación para ambas parejas de cebadores se reflejan en la Tabla 3.5.

Inicialmente, los aislamientos fueron analizados en agarosa 1% con objeto de comprobar la integridad de los ARNs aislados (Figura 4.39).

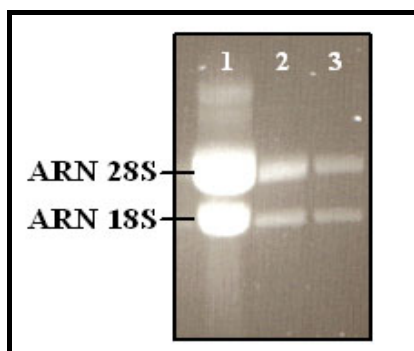


Figura 4.39. Aislamiento de ARN de levaduras (construcción Δ N6118VLPZ) en gel de agarosa al 1,5%. Calles 1: aislamiento original; 2: dilución 1/10; 3: dilución 1/10 tratada con DNasa a 37°C.

El siguiente paso consistió en el tratamiento de los ARNs con DNasa I. El tratamiento con dicha nucleasa en las muestras de ARN se ajustó hasta comprobar que no se producía amplificación por PCR sobre las muestras de ARN tratado (controles RT-), empleando los oligonucleótidos mencionados. Los ajustes iniciales correspondieron a 1 U de enzima por cada 15-20 μ g de ácidos nucleicos totales aunque, como se observaba amplificación en dichas muestras RT- (Figura 4.40), esta cantidad se aumentó hasta 1U por cada 1-2 μ g de ácidos nucleicos totales.

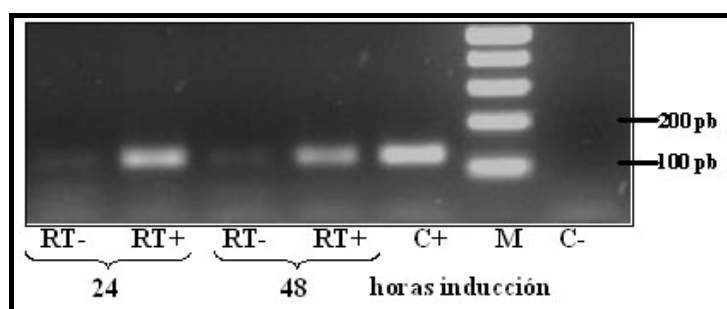


Figura 4.40. Análisis en agarosa al 2,5% de los productos de RT-PCR con los oligonucleótidos 18L1F600/AOXL1-8 sobre, ARN tratado con DNasa I, de la cepa X-33 transformada con la construcción Δ N6118VLPZ (1U por cada 15-20 μ g) (RT-) y ADNc de la construcción 18VLPZ (RT+). C+: control positivo de ADN de la misma construcción, C-: control negativo de PCR. Se observan bandas de amplificación en las muestras correspondientes al ARN tratado.

Los aislamientos de ARN realizados de los clones recombinantes, fueron analizados a distintos tiempos de inducción (generalmente 0, 12, 24, 48 y 72 horas)

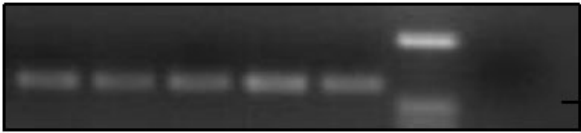
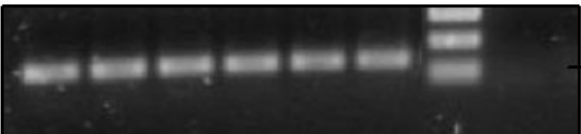
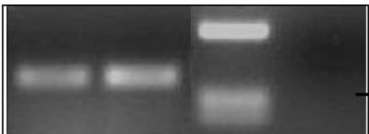
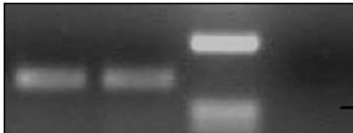
Resultados

mediante RT-PCR. Se pudo comprobar que existía amplificación en todos los clones recombinantes seleccionados y que, todas las bandas, tanto las obtenidas por amplificación con los cebadores TEFFW3/TEFRV3, como con los cebadores 18L1F600/AOXL1-8, presentaban la misma intensidad (Tablas 4.5 A, B y C). En las amplificaciones realizadas sobre el ADNc de la cepa X-33 transformada con el plásmido pPICZA, no recombinante (tiempos 0 y 48 horas post-inducción), no se observaron bandas (resultados no mostrados).

A

Construcción	Cepa	Región	Agarosa 2%
18VLPZ	X-33	L1	
		TEF	
	KM71H	L1	
		TEF	

B

Construcción	Cepa	Región	Agarosa 2%
ΔN6118 VLPZ	X-33	L1	 C+ 0 12 24 48 M C- Horas inducción 100 pb
		TEF	 0 12 24 48 72 C+ M C- Horas inducción 100 pb
	X-33 Fermen- tador	L1	 24 48 M C- Horas inducción 100 pb
		TEF	 24 48 M C- Horas inducción 100 pb

C

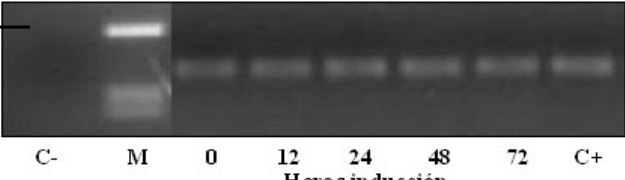
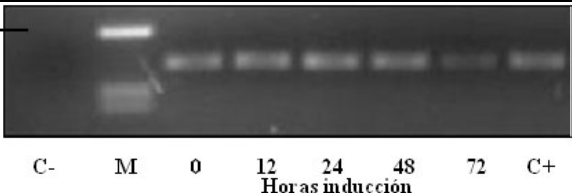
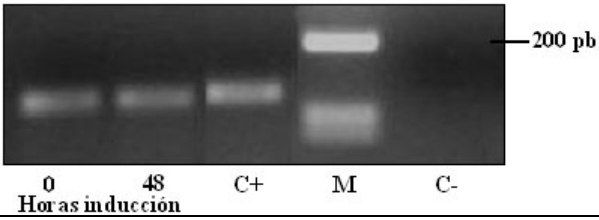
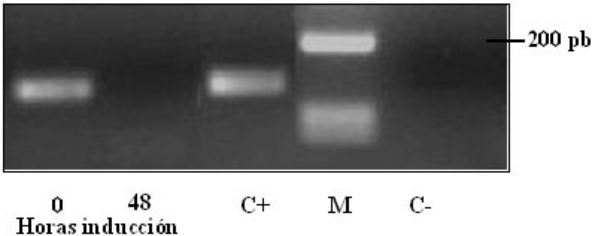
Construcción	Cepa	Región	Agarosa	
18L1Z α	X-33	L1		
		TEF		
	KM71H	L1		
		TEF		

Tabla 4.5. Análisis de los productos de RT-PCR obtenidos con los oligonucleótidos que amplifican la región L1y el control de expresión (TEF) para las construcciones (A) 18VLPZ, (B) Δ N618VLPA y (C) 18VLPZ α . C+: control positivo de ADN, C-: control negativo de ADN.

Por tanto, se detectó transcripción específica del casete insertado en todas las construcciones, pero sin embargo, siempre a unos niveles basales no inducibles con metanol. Se plantearon así varias posibilidades que deberán ser abordadas en trabajos futuros y que se discutirán más adelante, relacionadas con: la deficiente inducción del promotor, la existencia de transcritos truncados o inestables debidos a la presencia de secuencias que podrían actuar como terminadores tempranos de la transcripción o incluso problemas inherentes al proceso de traducción, relacionados con la secuencia de Kozak o la frecuencia de utilización de codones.

4.3 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA L1 DE VPH18 EN CÉLULAS DE INSECTO

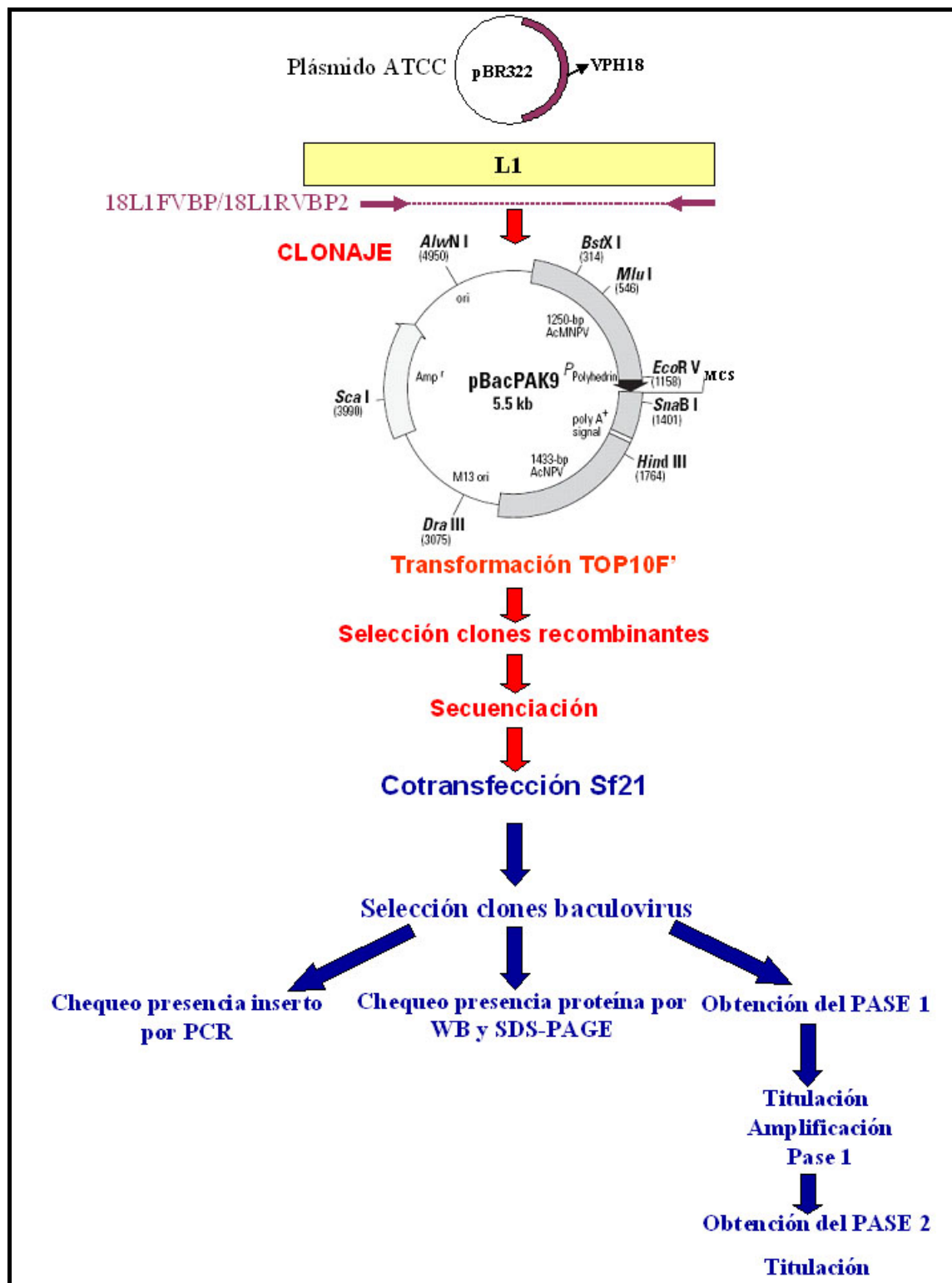


Figura 4.41. Esquema de pasos seguidos para la obtención de baculovirus recombinantes. En color rojo se indican los pasos llevados a cabo en *E. coli* y en color azul en células de insecto.

En este caso, se pretendió la producción de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto, empleando el sistema de baculovirus recombinantes. Para ello se generó la construcción Δ N6118VLP, realizada a partir del tercer ATG de la secuencia que codifica dicha proteína. La región L1 se amplificó a partir del genoma de VPH18 contenido en un plásmido comercial. El producto de PCR se clonó en el vector pBacPAK9 (Figura 4.41), y con los vectores recombinantes y el ADN viral comercial BacPAK6, se cotrasfectaron células Sf21, para generar baculovirus recombinantes. Con éstos se llevaron a cabo diversas infecciones para el estudio de la cinética de expresión de la proteína L1 de VPH18, así como para la purificación de VLPs. El proceso se detalla a continuación.

4.3.1 Amplificación de la región L1 de VPH18

Para la amplificación de la secuencia que codifica la proteína L1 de VPH18 a partir del tercer ATG, se diseñó la pareja de cebadores 18L1FWBP/18L1RVBP2 (Tabla 3.4) que amplifican un fragmento de 1542 pb, y que presentan dianas *Eco*RI y *Xho*I respectivamente (Figura 4.42, A), para realizar una clonación dirigida en el vector pBacPAK9 que actúa como un vector de transferencia. Las condiciones de amplificación se detallan en el apartado 3.2.4. Como ADN molde se utilizó el plásmido 45152 de la ATCC, que contiene el ADN de VPH18 clonado en el plásmido pBR322. Se obtuvo un amplicón de tamaño esperado (1542 pb) (Figura 4.42, B).

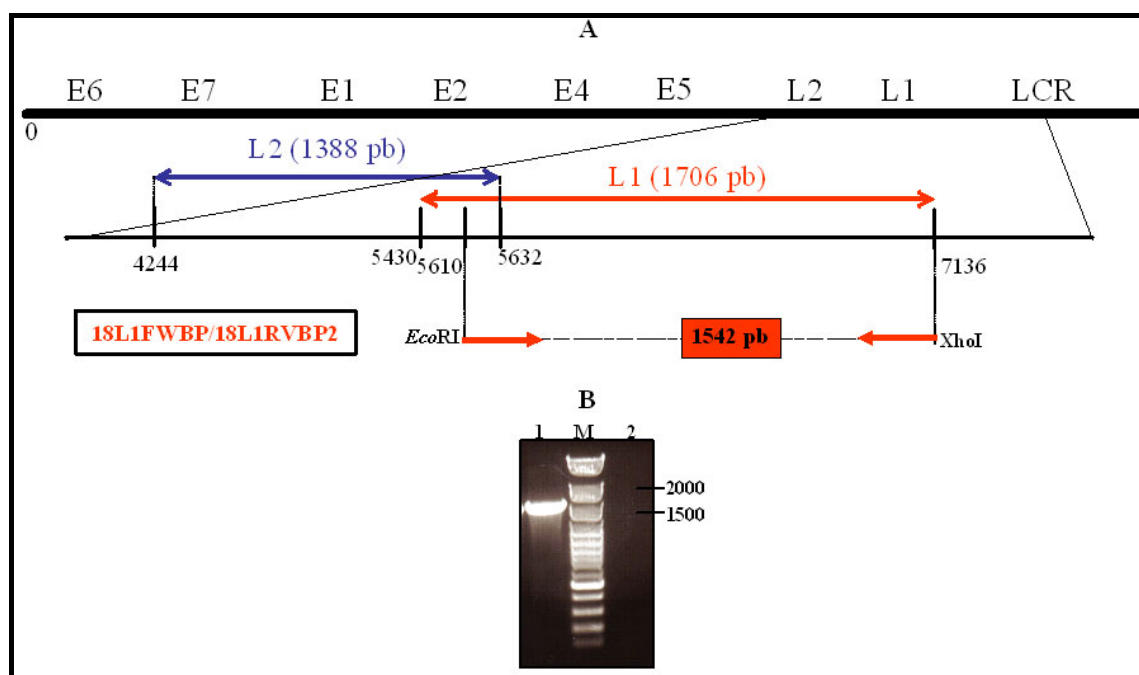


Figura 4.42: (A) Esquema que indica la localización de la pareja de cebadores empleada para la amplificación de la región L1 y su posterior expresión células de insecto. (B) Análisis del producto de amplificación obtenido con la pareja de cebadores 18L1FWBP/18L1RVBP2. Calle 1: amplificación sobre ADN plasmídico de pBR322 conteniendo ADN de VPH18, Calle 2: control negativo de amplificación, M: marcador de tamaño molecular.

4.3.2 Clonación dirigida en el vector pBacPAK9

El amplicón de PCR 18L1FWBP/18L1RVBP2 fue clonado en el vector pBacPAK9 (apartado 3.2.9).

La integridad de la secuencia de L1 de VPH18, en los clones recombinantes fue determinada mediante secuenciación, empleando cebadores comerciales diseñados sobre el vector (Bac1 y Bac2) así como cebadores diseñados sobre la región L1 (18L1F600, 18L1F700, 18L1F800 y ForwardT; Figura 3.1). No se observó ningún cambio con respecto a la secuencia prototipo X05015 (Anexo 1). La secuencia aminoacídica deducida correspondió a una proteína de 56 KDa.

4.3.3 Obtención y análisis de baculovirus recombinantes

Tras la generación de baculovirus recombinantes en la línea celular Sf21 (apartado 3.2.12) se realizó en primer lugar la comprobación del carácter recombinante de los mismos. Para ello, se realizaron amplificaciones de los aislamientos de ADN total de las células de insecto infectadas, obtenidas en el paso de amplificación y generación del PASE 1. Además, también se llevó a cabo el análisis de extractos crudos de

proteínas de estas células así como la inmunodetección de la proteína recombinante, mediante WB con los sueros comerciales.

Para las amplificaciones se emplearon los oligonucleótidos Bac1/Bac2 (Tabla 3.4). Las condiciones de amplificación se recogen en la tabla 3.5. Tras el análisis en agarosa de los amplicones, se observó un fragmento amplificado de tamaño esperado (1542 pb) en las células recogidas de todas las infecciones realizadas, lo que indicó, que todos los clones de baculovirus aislados eran recombinantes (Figura 4.43 A).

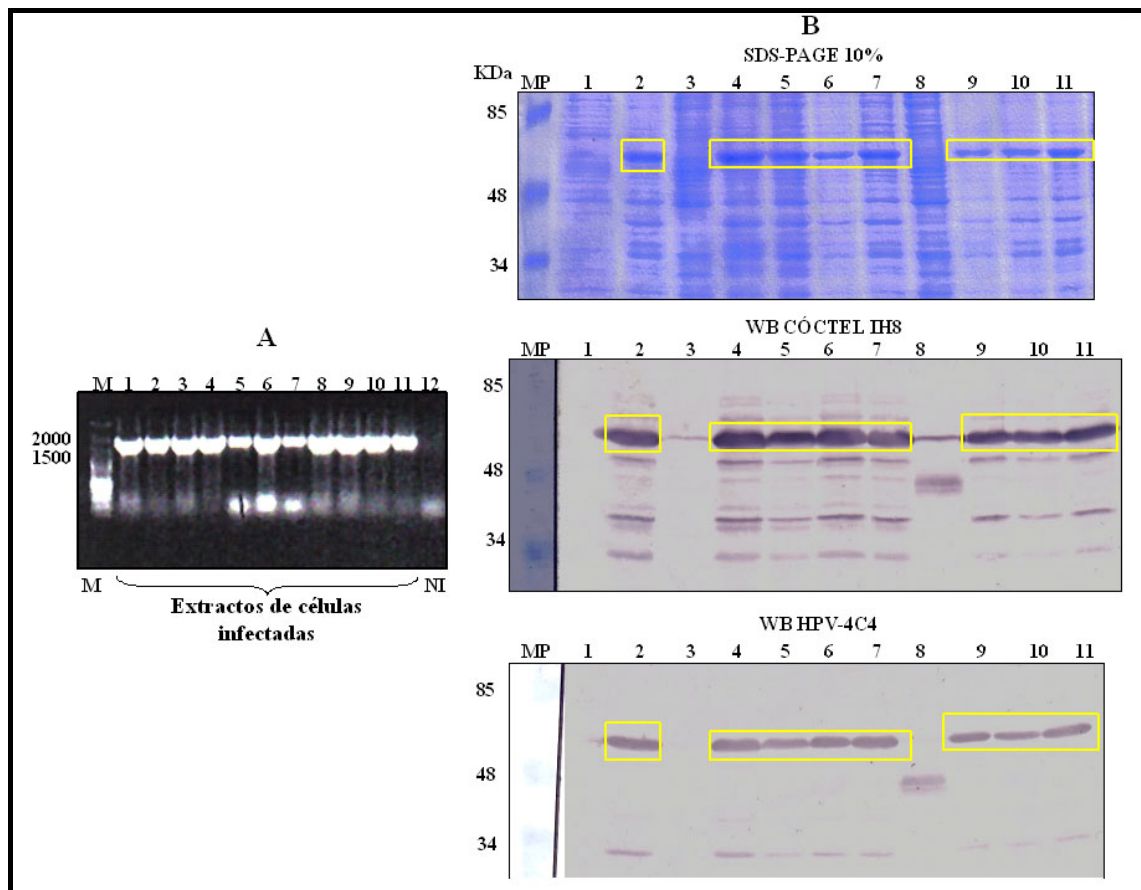


Figura 4.43. Análisis molecular de las células Sf21 infectadas con cada una de las 11 placas de lisis. **(A):** análisis por PCR empleando los cebadores Bac1/Bac2. Se observa un amplicon de tamaño esperado (1542 pb) para las 11 placas de lisis (Calles 1 a 11). Calle 12: células no infectadas. M: marcador de tamaño molecular. **(B):** Análisis mediante SDS-PAGE y WB con anticuerpos comerciales (IH8 y HPV-4C4). Calle 1: células no infectadas. Calles 2 a 11: extractos crudos de células infectadas. Sólo aparecen bandas de tamaño esperado (~56 KDa) para 8 de las placas de lisis (recuadro amarillo). MP: marcador de peso molecular preteñido.

Mediante el análisis en SDS-PAGE de los extractos crudos de proteínas, se observó una banda más intensa, situada entre el marcador de peso molecular de 48 y el de 85 KDa, en 8 de los 10 extractos crudos analizados (tamaño esperado de ~56 KDa).

Esta misma banda fue detectada mediante WB con el cóctel de IH8 y el anticuerpo monoclonal HPV-4C4 (Figura 4.43 B).

Identificados los baculovirus recombinantes, uno de ellos fue seleccionado y titulado mediante ensayo de placas (apartado 3.2.12 d) con objeto de poder realizar infecciones con Índices de Multiplicidad (MOIs) conocidos, obteniéndose un título de $1,45 \times 10^8$ ufp/ml para el pase 1 y de $1,8 \times 10^8$ ufp/ml para el pase 2, con el que se continuó trabajando.

4.3.4 Estudio de la cinética de expresión de la proteína Δ N6118VLP

Los ensayos de cinética se realizaron según se indica en el apartado 3.2.14.3. Se analizaron extractos crudos de alícuotas de cultivos infectados por SDS-PAGE y WB empleando el anticuerpo HPV-4C4. En todos los experimentos se incluyó, en alguna de las membranas, el análisis de extractos crudos de células no infectadas, con objeto de corroborar la especificidad de las bandas detectadas.

Para realizar la optimización de la producción de la proteína, se valoraron dos líneas celulares (Sf9 y Sf21), el efecto del suero fetal bovino (SFB) como complemento del medio, el índice de multiplicidad de la infección (MOI) y el tiempo de infección.

a) Análisis de la producción de proteínas en líneas celulares Sf9 y Sf21, y en presencia/ausencia de SFB

La primera aproximación consistió en determinar qué línea celular (Sf9 o Sf21) era capaz de producir la proteína Δ N6118VLP en niveles mayores, y establecer si la presencia de SFB al 10%, tenía un efecto positivo, negativo o no tenía ningún efecto sobre la cantidad y calidad de proteína producida. Para llevar a cabo estos ensayos, se seleccionó, de forma aleatoria, un MOI de 5. Las infecciones se realizaron cuando los cultivos alcanzaron una densidad celular de 1×10^6 células/ml, momento en el cual se añadió en su caso, el SFB.

En estas inmunodetecciones se observó una banda de tamaño esperado (aproximadamente 56 KDa), en todas las muestras a partir de las 24 horas de infección (Figura 4.44).

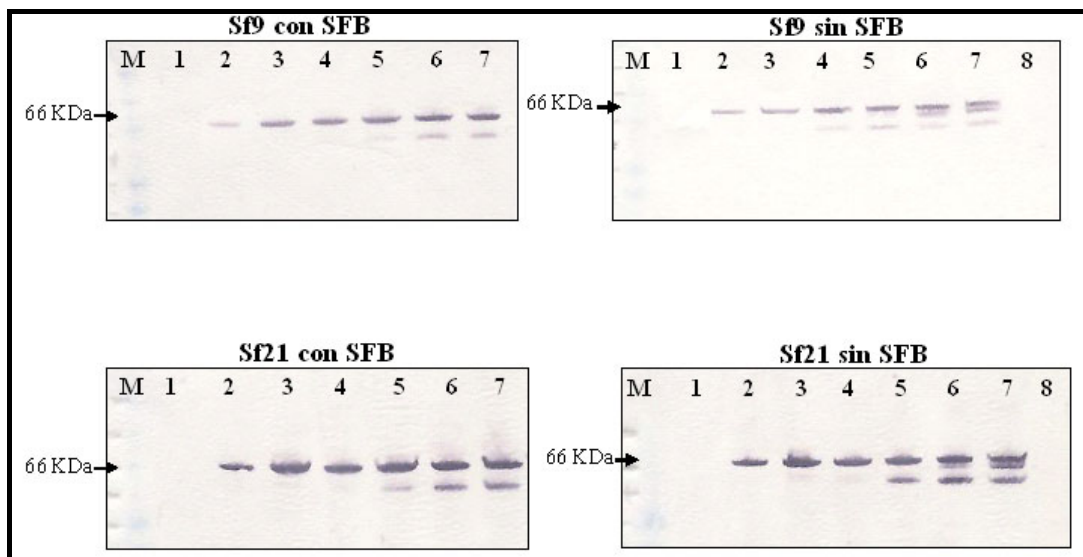


Figura 4.44. Análisis por WB de extractos crudos expresando la proteína $\Delta N6118VLP$, separados en NuPAGE-SDS 4-12%, obtenidas en las líneas celulares Sf9 y Sf21 (MOI 5 ufp/célula) con HPV-4C4. Calles 1: 0h; 2: 24h; 3: 48h; 4: 72h; 5: 96h; 6: 120h; 7: 144 h, 8: extracto crudo de células no infectadas. SFB: suero fetal bovino.

El análisis densitométrico de los geles (3.2.15.6) reveló que, los niveles máximos de expresión se alcanzaron, en la línea celular Sf9 a las 48-72 horas cuando el medio se suplementó con SFB y a las 72 horas en ausencia de éste. En la línea celular Sf21, los niveles máximos de expresión de la proteína se alcanzaron a las 48 horas tanto en ausencia como en presencia de SFB. En todas las muestras se pudo observar, en mayor o menor intensidad, una segunda banda por debajo de la banda de 56 KDa, a partir de las 72 horas y, en algunas muestras, una tercera banda a partir de las 96 horas. Éstas podrían ser debidas a degradación de la proteína a lo largo del tiempo de infección.

Con objeto de determinar en qué condiciones se obtenía la expresión óptima, se realizó un WB con las muestras correspondientes a los valores máximos de expresión de cada ensayo. Tras el análisis mediante el programa Image Quant, los máximos niveles de expresión fueron detectados en células Sf21, cuando se expresaba en medio suplementado con SFB (Figura 4.45).

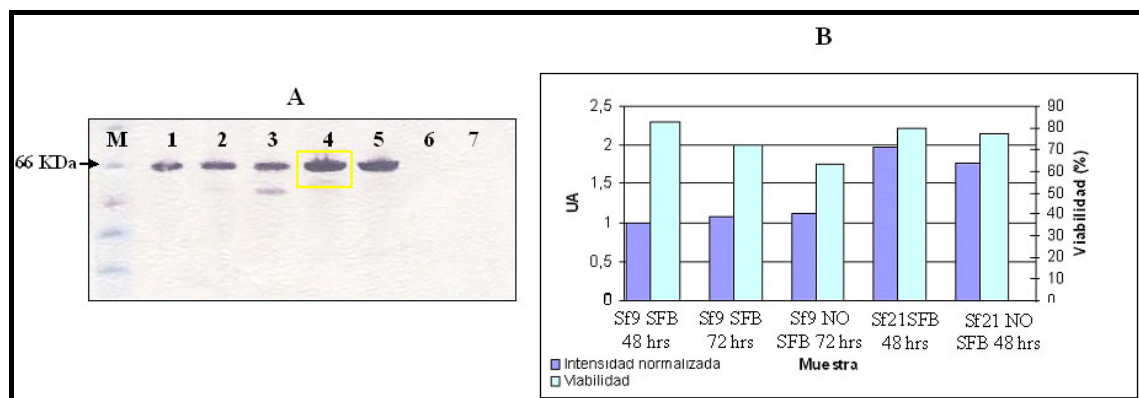


Figura 4.45. **(A)** Análisis por WB de alícuotas de extractos crudos de las muestras con mayores niveles de expresión de la proteína $\Delta N6118VLP$ en NuPAGE-SDS (4-12%). Calles 1: células Sf9 con SFB 48 horas; 2: células Sf9 con SFB 72 horas; 3: células Sf9 sin SFB 72 horas; 4: células Sf21 con SFB 48 horas; 5: células Sf21 cells sin SFB 48 horas; 6: células Sf9 no infectadas; 7: células Sf21 no infectadas. M: marcador de peso molecular. **(B)** Datos obtenidos del análisis densitométrico del WB junto con los datos de viabilidad celular de la muestra. UA: unidades arbitrarias.

b) Análisis de la producción de proteínas en la línea celular Sf21 empleando diferentes índices de multiplicidad de la infección (MOIs)

Una vez determinada la línea celular que expresaba la proteína en mayores cantidades, así como el efecto que tenía el SFB en la expresión, se trató de determinar, de entre cuatro MOIs con los que se trabaja frecuentemente (0,1; 1; 5 y 10), con cuál se obtenían mayores niveles de expresión de la proteína $\Delta N6118VLP$. Las infecciones se realizaron según se describe en el apartado 3.2.14.3, añadiéndose SFB al 10% en el momento de la infección, y se mantuvieron durante un máximo de 168 horas, en función de los recuentos y las viabilidades celulares, que se determinaron cada 12 y/o 24 horas. En estos periodos de tiempo, se tomaron las alícuotas de 1,5 ml, que fueron posteriormente analizadas cualitativa y cuantitativamente mediante WB.

Se observó, según lo esperado, que los índices de multiplicidad más bajos, permitían alcanzar viabilidades y densidades celulares superiores, confirmándose así la correcta infección de los cultivos (Figura 4.46).

Así, mediante WB y análisis densitométrico, se determinó que las mayores intensidades se obtenían entre 48 y 72 horas para todos los MOI excepto para el índice más bajo (0,1) donde se requirieron tiempos superiores de infección (72 y 96 horas) (Figura 4.47).

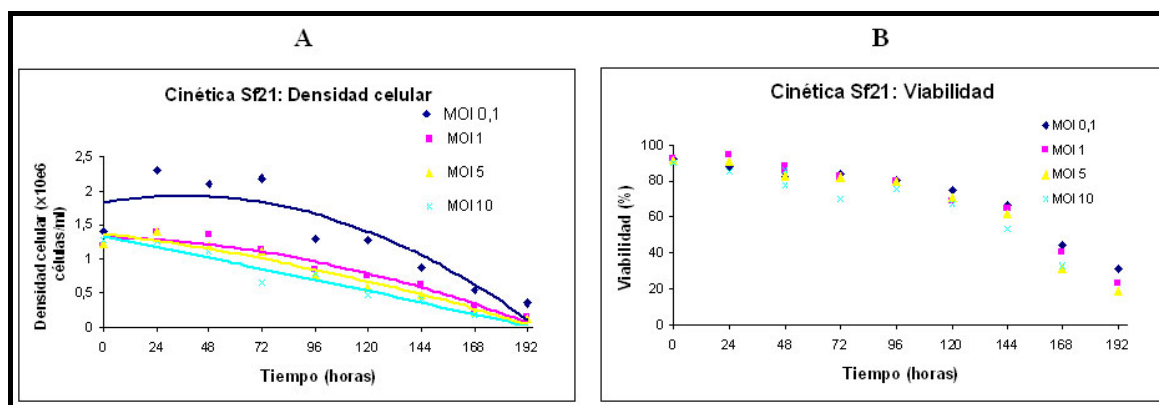


Figura 4.46. Gráficos de densidades celulares (A) y viabilidades (B) analizadas cada 24 horas en infecciones de células Sf21 con diferentes MOIs.

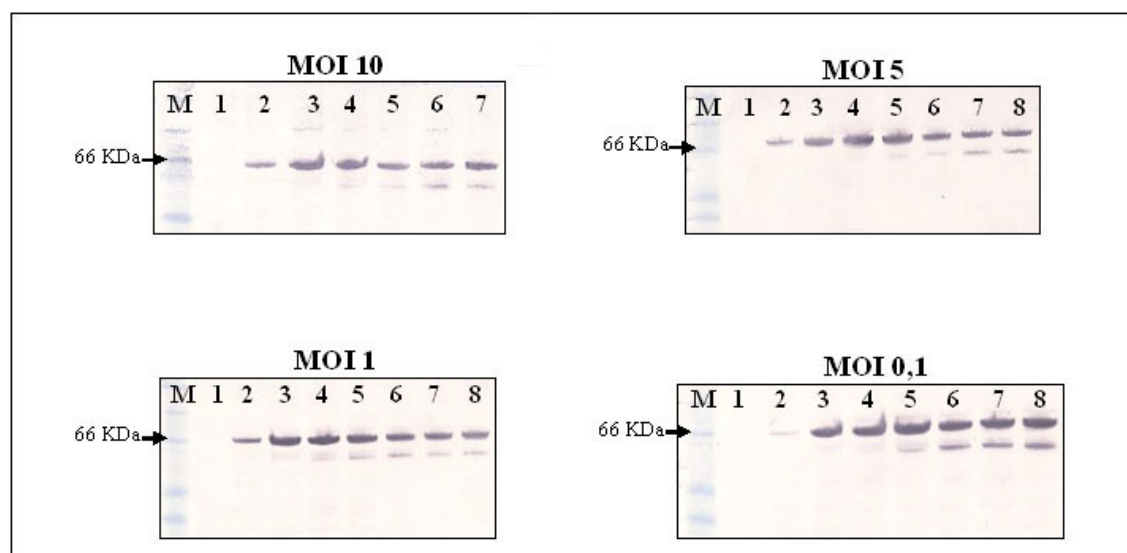


Figura 4.47. Análisis por WB de alícuotas de extractos crudos de células Sf21 infectadas con distintos MOIs separadas en NuPAGE-SDS en gradiente 4-12%. Calles 1: 0 horas, 2: 24 horas, 3: 48 horas, 4: 72 horas, 5: 96 horas, 6: 120 horas, 7: 144 horas, 8: 168 horas.

Para determinar las condiciones óptimas (MOI y tiempo) para la expresión de proteína, se compararon densitométricamente los máximos obtenidos en los experimentos anteriores, en un mismo WB. En este caso, aunque sin diferencias excesivamente grandes, los mayores niveles de expresión detectados mediante este método se correspondieron con una infección de 48 horas, empleando un MOI de 5 (Figura 4.48).

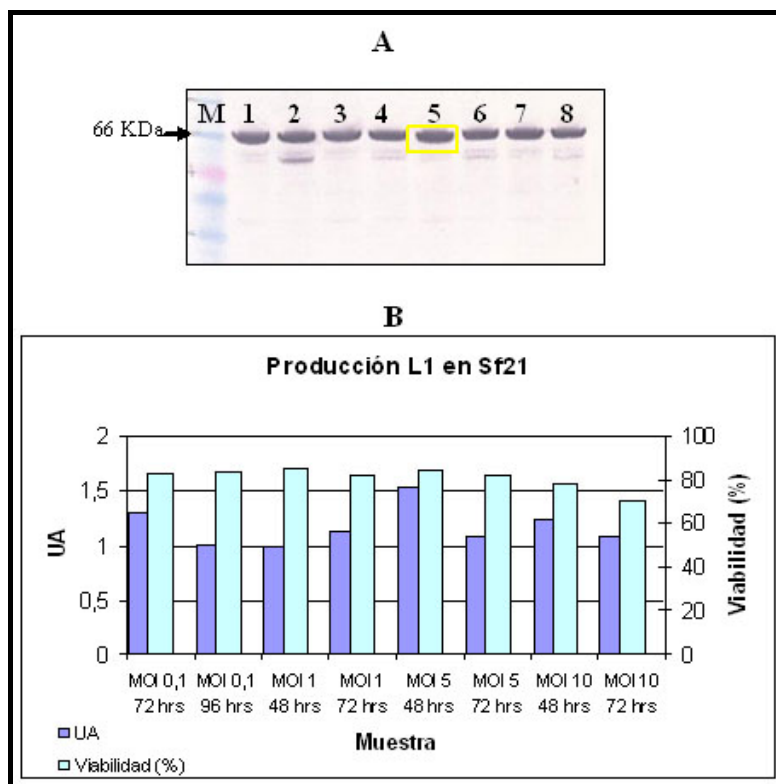


Figura 4.48: **(A)**: Inmunodetección de muestras con los mayores niveles de expresión con los diferentes MOIs separadas en NuPAGE-SDS (4-12%). Calles 1: MOI 0,1; 72 horas; 2: MOI 0,1; 96 horas, 3: MOI 1; 48 horas; 4: MOI 1; 72 horas; 5: MOI 5; 48 horas; 6: MOI 5; 72 horas; 7: MOI 10; 48 horas; 8: MOI 10; 72 horas de infección. **(B)**: Datos obtenidos del análisis densitométrico del WB. Los niveles de expresión máximos se obtienen con un MOI de 5 a las 48 horas de expresión. UA: unidades arbitrarias.

4.3.5 Producción y purificación de VLPs de VPH18

Una vez analizada la expresión de la proteína $\Delta N6118VLP$, el siguiente paso consistió en la purificación y análisis de partículas similares al virus (VLPs).

Se realizó un protocolo de purificación de VLPs en células Sf21 empleando los cuatro MOIs analizados en los ensayos de cinética, llevando a cabo las infecciones en células Sf21, con medio suplementado con SFB, condiciones óptimas obtenidas en los ensayos previos. Aunque en este caso se emplearon fermentadores para obtener mayor cantidad de muestra, las infecciones se mantuvieron durante los tiempos establecidos en los ensayos de la cinética de expresión de la proteína (72 horas para el MOI 0,1, y 48 horas para los MOI 1, 5 y 10). Además se realizó un ensayo en células Sf9, con MOI 5, seleccionado aleatoriamente, con objeto de comparar una vez más el rendimiento de ambas líneas celulares.

Para cada MOI se infectaron 3 fermentadores con 250 ml y cada 24 horas se llevaron a cabo recuentos celulares y determinaciones de la viabilidad. Al final del

periodo de infección los 750 ml de cultivo infectado, correspondientes a cada MOI, se procesaron de manera conjunta.

Tras la lisis y ultracentrifugación, se recogieron las bandas obtenidas en el gradiente de cloruro de cesio y se sometieron a desalado (apartado 3.2.14.3 b). En todos los casos se realizó una monitorización de este proceso, valorando la absorbancia a 280 nm así como la conductividad de cada una de las muestras. La concentración de proteínas totales en las fracciones recuperadas tras el desalado, se determinó mediante ensayo colorimétrico. Las muestras se valoraron por WB (previa concentración 10 veces mediante precipitación con etanol), mediante microscopía electrónica (previa concentración con el sistema Microcon YM-10) y mediante DLS (previa dilución en tampón PBS suplementado).

Durante la infección, para los fermentadores correspondientes a MOIs 1, 5 y 10 se observó una disminución de la densidad celular y de la viabilidad a medida que aumentaba el tiempo, de forma más acusada en el caso de los MOIs más altos (5 y 10). Para el MOI 0,1 se pudo observar crecimiento durante las primeras 48 horas de infección, y a partir de este momento, comenzó a disminuir el número de células viables (salvo en un fermentador en el que pareció producirse un descenso continuo del número de células viables a lo largo de toda la infección). En cuanto a las viabilidades, la tendencia general fue a mantenerse más o menos estables durante las primeras 48 horas, sufriendo una pequeña disminución al final de la infección (Figura 4.49).

Tras la ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio, en las muestras correspondientes a los MOI 0,1; 1 y 10, se recuperó una única banda en el gradiente, situada a 1,5 cm del fondo del tubo y cuyos índices de refracción correspondientes se situaron en torno a 1,360 (Tabla 4.6).

Para el MOI 5, se detectaron, en ambas líneas celulares (Sf9 y Sf21), dos bandas en el gradiente de CsCl. La banda más próxima al fondo del tubo (a 1,3 cm) era más fina, pero más azulada, como las típicas bandas para VLPs de VPH. Se recuperaron las dos bandas y se midió el índice de refracción, siendo de 1,358 para la banda superior y de 1,362 para la inferior (células Sf21).

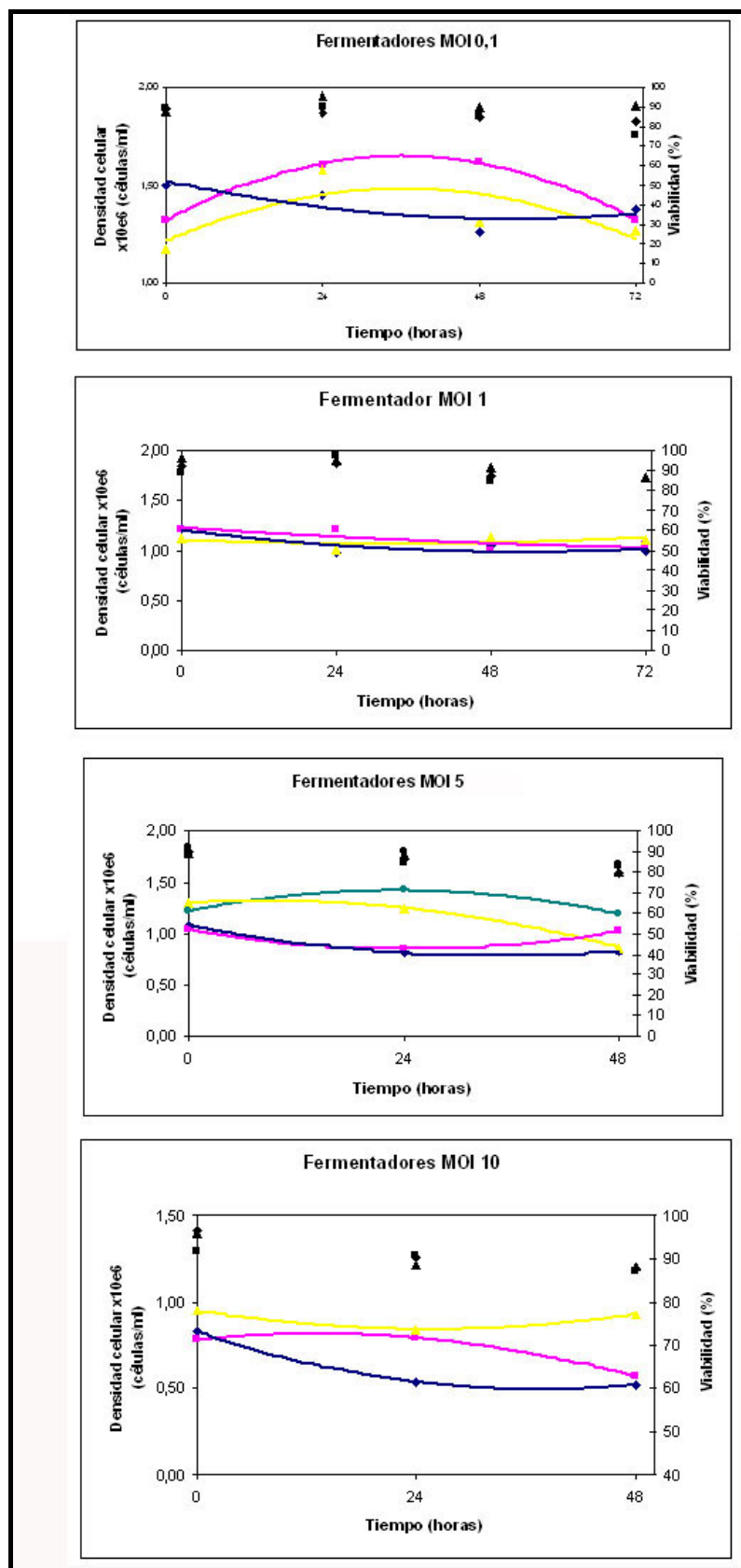


Figura 4.49. Monitorización de la densidad celular (líneas de color amarillo rosa y azul para cada uno de los tres fermentadores empleados) y viabilidad (negro) de los fermentadores infectados con diferentes MOI para la purificación y caracterización de VLPs de VPH18, en células Sf21.

A continuación, las muestras se sometieron a eliminación del cloruro de cesio (desalado) (apartado 3.2.14.3). Todas las muestras, salvo las correspondientes a MOI 5 en células Sf21, eluyeron en dos picos de Absorbancia a 280 nm, uno de ellos muy próximo al pico de conductividad, correspondiente a la salida del cloruro de cesio (Figura 4.50). Recuperadas las muestras desaladas, se midió, empleando un método colorimétrico, la concentración de proteínas totales contenidas en cada una de ellas, que aparecen reflejadas en la Tabla 4.6. Las concentraciones más altas de proteínas se detectaron en las muestras correspondientes a los MOI 1, 5 (línea celular Sf21) y MOI 10.

Con objeto de determinar la presencia de la proteína L1 de VPH 18, las muestras, 10 veces concentradas mediante precipitación con etanol, fueron sometidas a análisis mediante WB empleando el anticuerpo comercial HPV-4C4. Para las muestras correspondientes a MOI 0,1 no se detectó ninguna banda. Para las muestras correspondientes al MOI 1 se observaron bandas muy tenues, en tanto que para el MOI 5, en la línea celular Sf21 se detectaron bandas aún sin concentrar las muestras. Para este mismo MOI en la línea Sf9 fue necesaria la concentración para poder detectar bandas de tamaño esperado (56 KDa) en WB. Para el MOI 10, se obtuvieron bandas claras en ambas eluciones del desalado (Figura 4.51).

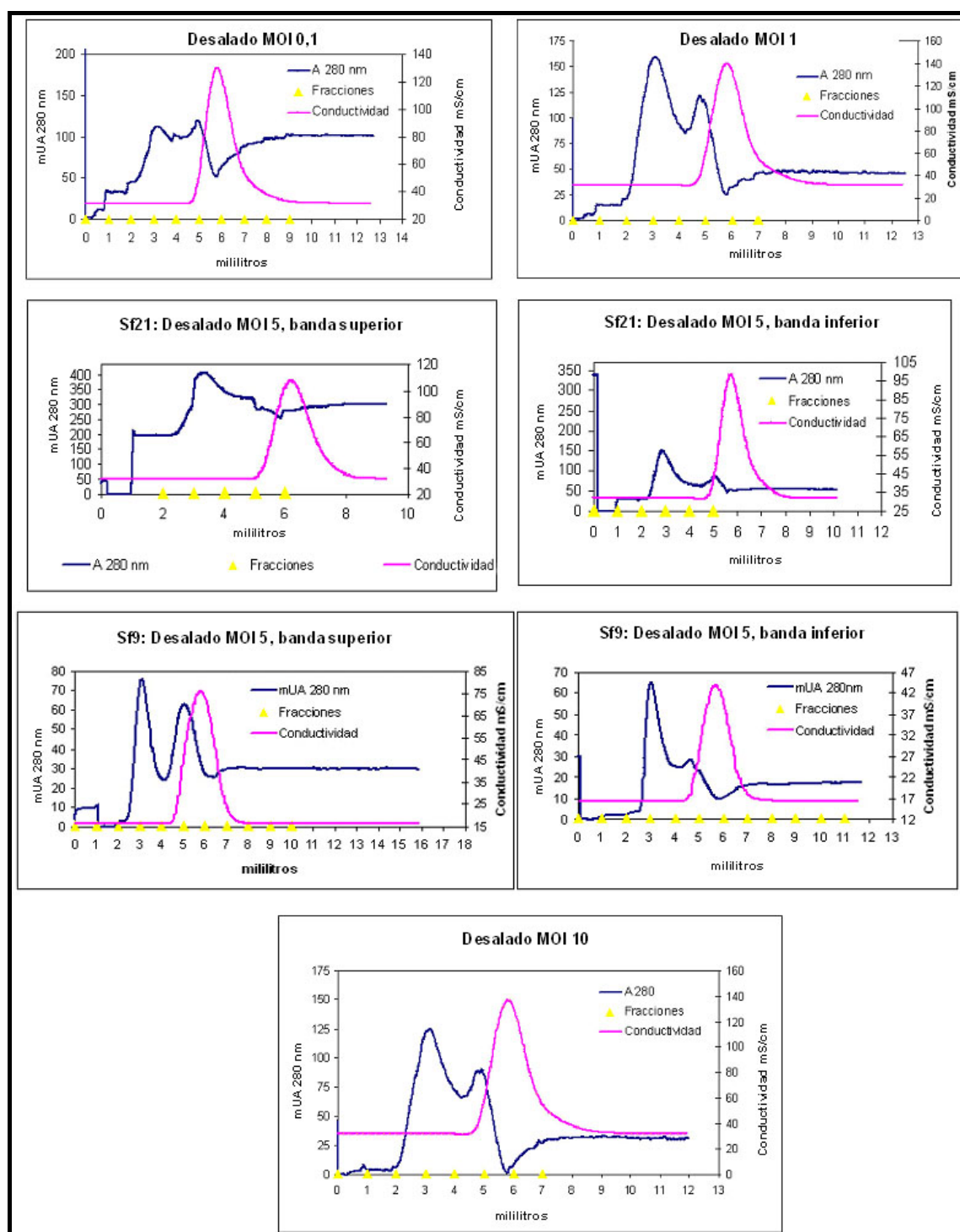


Figura 4.50. Gráficos de monitorización de la A₂₈₀ (curvas azules) y conductividad (curvas rosas) durante el proceso de desalado para las distintas muestras obtenidas durante la infección con diferentes MOIs.

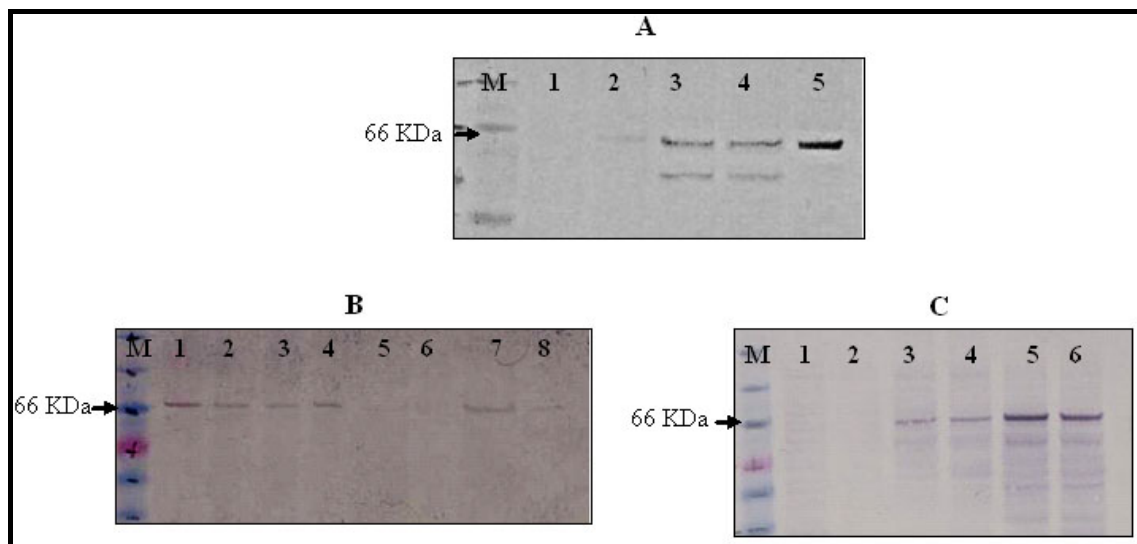


Figura 4.51. Inmunodetección de muestras de VLPs tras el desalado separadas en NuPAGE-SDS. **(A)** Muestras de MOI 5 en células Sf9, calles 1: banda superior 1ª fracción, 2: banda superior 2ª fracción, 3: banda inferior, 1ª fracción, 4: banda inferior 2ª fracción, 5: extracto crudo de la inducción. **(B)** Muestras de MOI 5 en células Sf21, no concentradas. Calles 1 a 3: extractos crudos de alícuotas de los fermentadores, 4: muestra antes de la centrifugación en CsCl, 5: banda superior tras el gradiente, en CsCl, 6: misma muestra tras el desalado, 7: banda inferior tras el gradiente, en CsCl, 8: misma muestra tras el desalado. **(C)** Muestras de MOIs 0,1; 1 y 10. Calle 1: 1ª fracción MOI 0,1; 2: 2ª fracción MOI 0,1; 3: 1ª fracción MOI 1, 4: 2ª fracción MOI 1; 5: 1ª fracción MOI 10, 6: 2ª fracción MOI 10.

El siguiente paso fue analizar las muestras desaladas y concentradas, mediante microscopía electrónica (ME), con objeto de detectar la formación de VLPs. No se detectaron partículas en las muestras correspondientes al MOI 0,1. Para el MOI 1, se observaron capsómeros en ambas muestras, y en la correspondiente a la primera fracción del desalado se observaron algunas partículas y acúmulos oscuros que podían corresponderse con agregados de partículas.

En los MOI 5 y 10 fue en los que se detectó mayor número de partículas de tamaño compatible con VLPs (50 nm) mediante ME. En el caso del MOI 5, para la línea Sf9 se observaron partículas en ambas muestras, pero estas fueron más abundantes en la banda situada a 1,3 cm del fondo del tubo, es decir, en la banda inferior (Figura 4.52, A). En el caso de la infección realizada con el mismo MOI en células Sf21 se pudieron observar partículas totalmente formadas, de aproximadamente 50 nm, sólo en el caso de la muestra correspondiente a la banda más próxima al fondo del tubo. En el caso de las muestras correspondientes a infecciones realizadas con MOI 10, se detectaron VLPs en ambas fracciones del desalado, sin embargo, en la muestra correspondiente a la segunda fracción, las partículas observadas fueron algo más pequeñas (~40 nm de diámetro) y además también se observaron partículas proteicas de 20-25 nm (Figura 4.52, B,C y D).

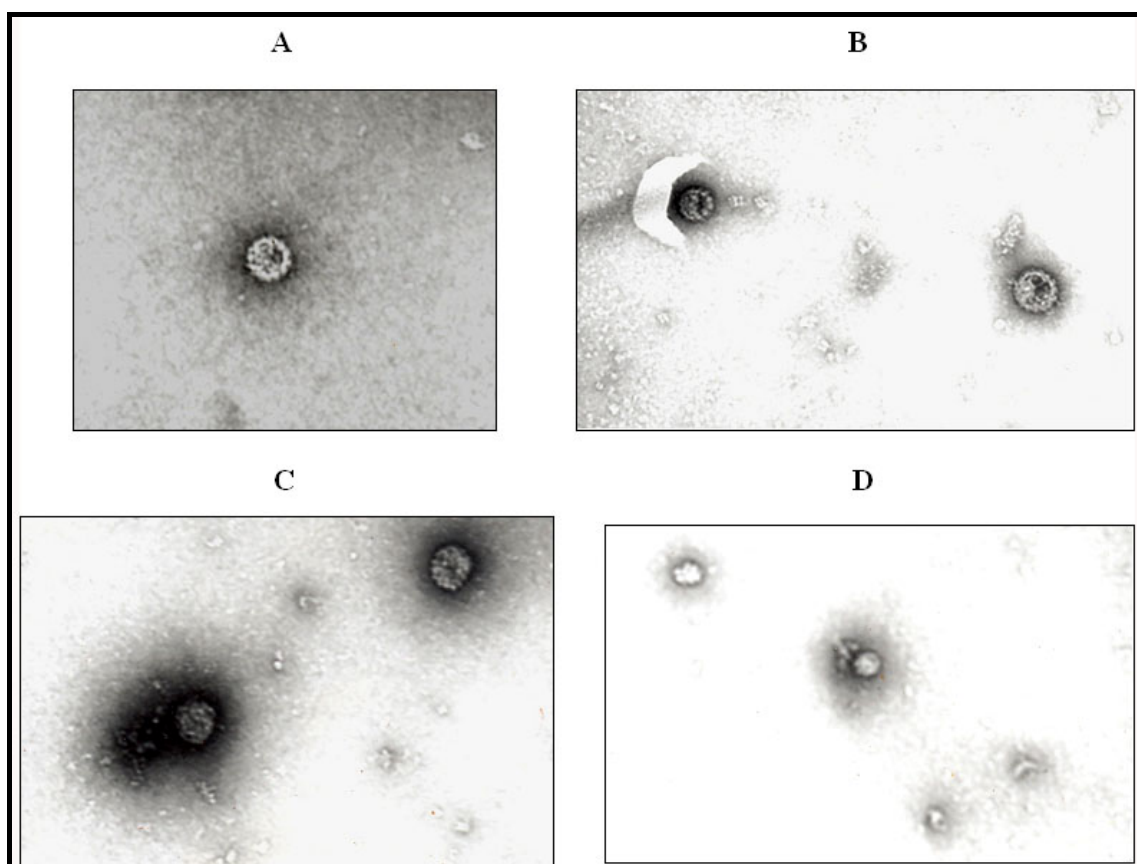


Figura 4.52. Imágenes de microscopía electrónica de muestras de VLPs obtenidas con **(A)** MOI 5 en células Sf9, 140K aumentos, **(B)**: MOI 10, VLPs bien formadas, tamaño 55 nm, obtenidas en la muestra correspondiente a la primera fracción recogida en el desalado, 100K aumentos. **(C)**: MOI 10, partículas de menor tamaño (40 nm) obtenidas en la 2ª fracción, 100K aumentos. **(D)**: MOI 10, agrupaciones de capsómeros de 20-25 nm de diámetro, obtenidos en la 2ª fracción, 100K aumentos.

Finalmente, las muestras a concentraciones de 30 ó 60 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 3.12), fueron sometidas a análisis mediante DLS. Para las muestras correspondientes al MOI 0,1 sólo se detectaron partículas de aproximadamente 20 nm, en la muestra correspondiente a la primera fracción recogida del desalado, que podrían corresponder con capsómeros, si bien éstas no se detectaron mediante ME (Figura 4.53). Para las muestras obtenidas con MOI 1 se obtuvieron fundamentalmente partículas de 10-15 nm de diámetro (Figura 4.53). En el caso de las muestras obtenidas tras infectar las células con MOI 5 en la línea celular Sf9 los resultados no coincidieron con los obtenidos en microscopía electrónica, puesto que se observó un pico para partículas de tamaño de 12-32 nm (capsómeros o agregados de capsómeros) en todas las muestras, mientras que aparecían sólo algunas partículas de tamaño esperado (40-50 nm) en las correspondientes a la primera fracción recogida durante el desalado (Figura 4.54). En

las muestras obtenidas en la línea celular Sf21, se obtuvieron fundamentalmente partículas de tamaño comprendido entre 15 y 20 nm, en tanto que sólo un 0,3% del total de partículas presentaban un tamaño de 50-55 nm (Figura 4.54).

Finalmente, para el MOI 10 para la primera fracción del desalado, se obtuvo un pico en partículas de tamaño entre 55 a 100 nm, y fundamentalmente partículas de tamaño entre 12 y 40 nm para la muestra correspondiente a la segunda fracción (Figura 4.53).

Las partículas producidas con MOI 5 en células Sf9, recogidas en la banda inferior del gradiente de CsCl, y recuperadas en la primera elución del desalado, fueron empleadas para la realización del ensayo de ELISA, con objeto de comparar la reactividad de los plasmas de hemodonantes y de pacientes caracterizados genéticamente, cuando se enfrentaban a éstas y a la proteína recombinante GST- Δ N7118L1 producida en *E. coli*, ver figura 4.29.

Línea celular	MOI(ufp /célula)	Tiempo infección (h)	Bandas en cloruro de cesio	Índice de refracción	Fracciones desalado	Concentración (µg/ml)	Detección en WB ¹	M.E. ²	Dilución DLS (µg/ml)	Tamaño partículas DLS (nm)
SF21	0,1	72	Única (1,5 cm)	1,358	1 ^a	91,82	No	No partículas	30	~20
					2 ^a	90,45	No	No partículas		<5
	1	48	Única (1,5 cm)	1,360	1 ^a	187,82	Tenue	Capsómeros	60	10-15
					2 ^a	159,64	Tenue	Capsómeros		
SF9	5	48	Superior (1,5 cm)	1,358	Única	170,55	No	No partículas	30	15-20
			Inferior (1,3 cm)		Única	171,45	Banda	VLPs		
	5	72	Superior (1,5 cm)	N.A.	1 ^a	98,36	No	VLPs	30	12-32
					2 ^a	92,30	Tenue			
					1 ^a	98,36	Tenue	VLPs (más abundantes)		
					2 ^a	70,48	Tenue			
SF21	10	48	Única (1,5 cm)	1,359	1 ^a	146,61	Banda	VLPs	60	55-100
					2 ^a	162,67	Banda	Partículas de 40 nm, capsómeros		12-40

Tabla 4.6. Resumen de resultados obtenidos en los distintos pasos de purificación y caracterización de VLPs de VPH tipo 18. 1: WB de las muestras 10 veces concentradas (salvo para MOI 5 en células Sf21) empleando el anticuerpo monoclonal HPV-4C4. 2: Microscopía electrónica. N.A.: no analizado.

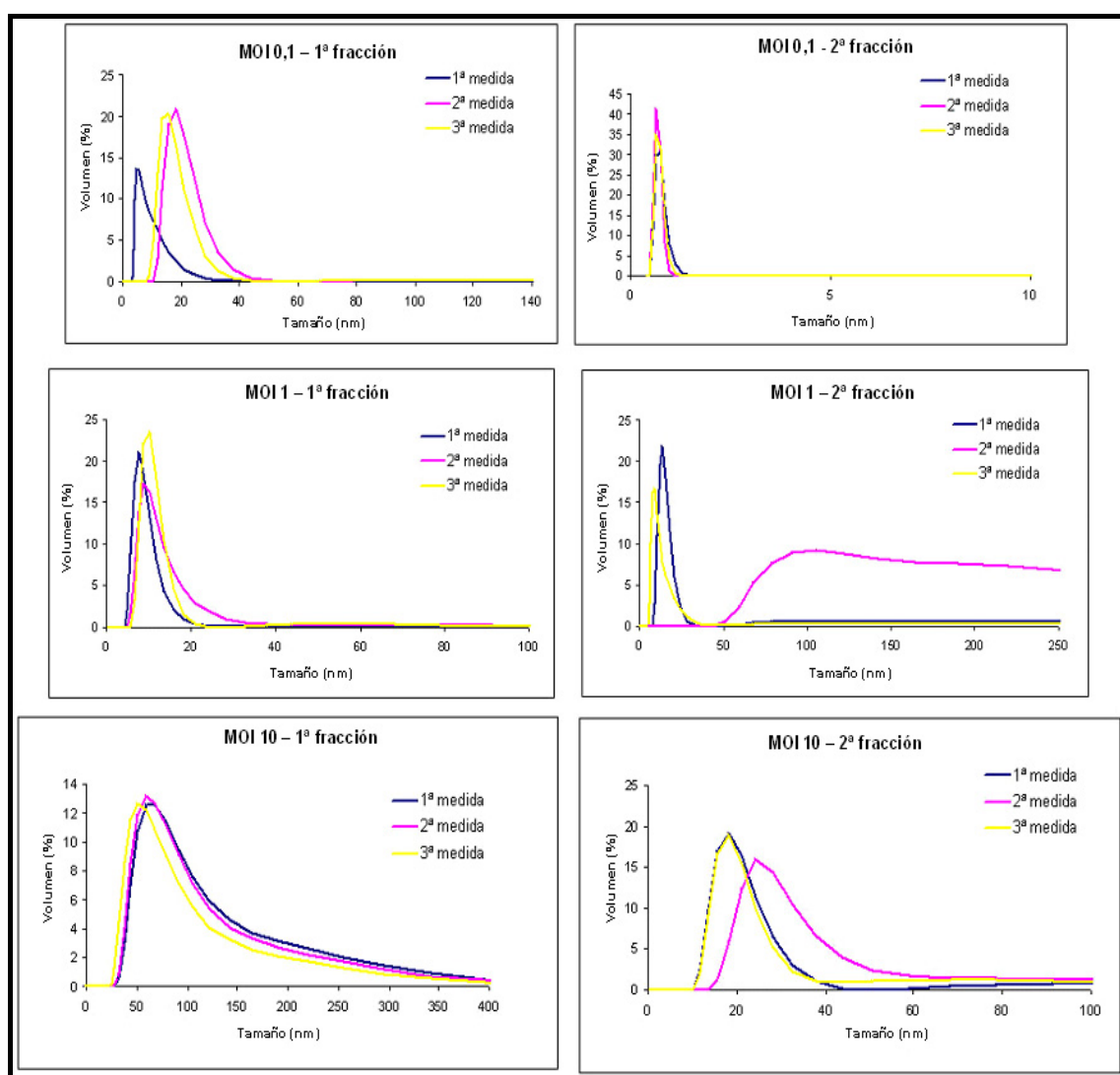


Figura 4.53. Gráficos obtenidos tras el análisis mediante DLS de las muestras de VLPs para los MOIs 0,1, 1 y 10 obtenidas tras el desalado.

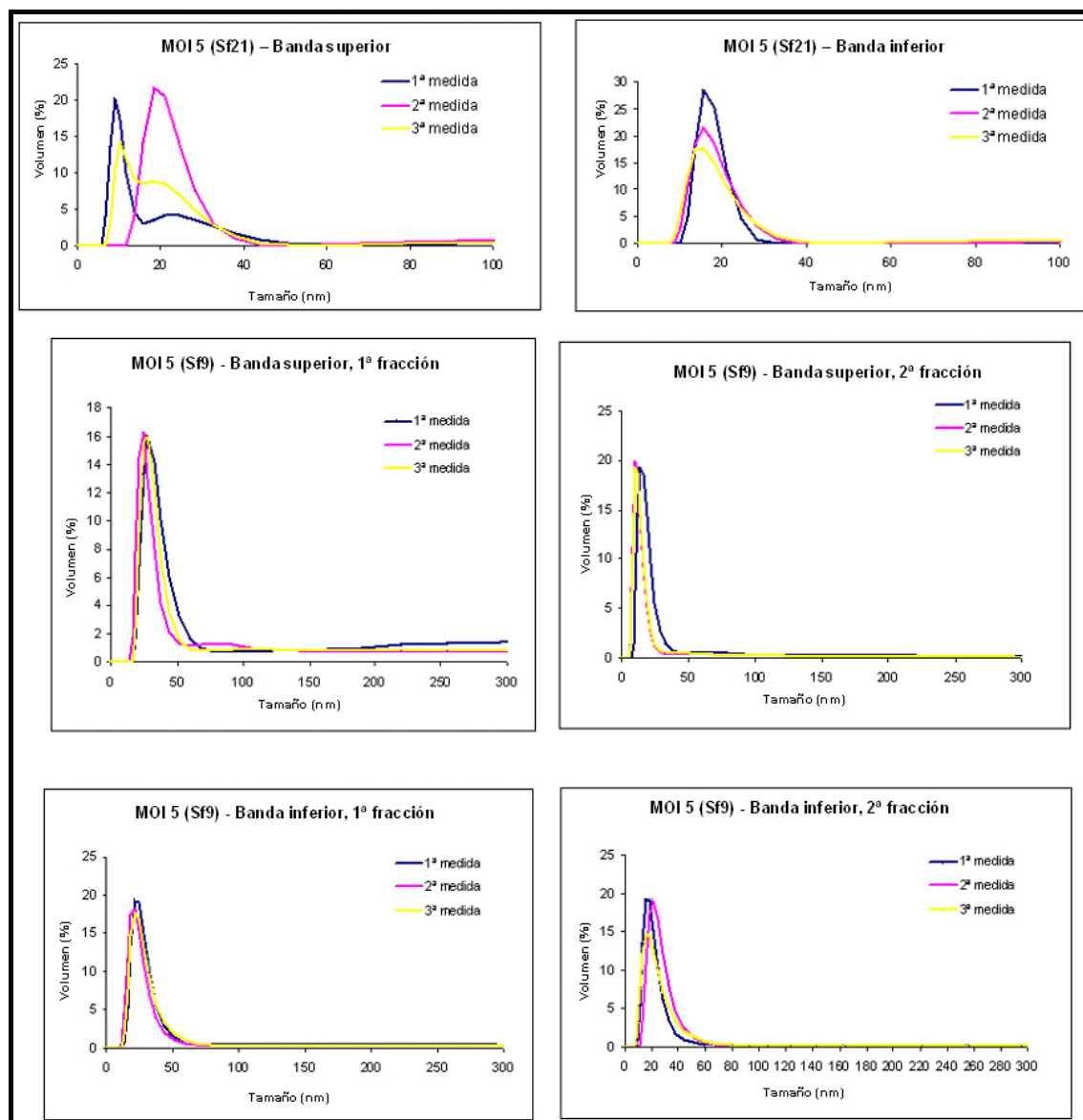


Figura 4.54: Gráficos obtenidos tras el análisis mediante DLS de las muestras de VLPs para el MOI 5 en células Sf9 y 21 obtenidas tras el desalado.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 INTRODUCCIÓN

La infección con VPH es una causa necesaria para el desarrollo de cáncer cervical. Cada año se registran 500.000 casos nuevos de esta neoplasia (Walboomers *et al.*, 1999) y más del 50% de todas las mujeres se infectarán con algún tipo de VPH a lo largo de su vida. De ellas, más del 80% clarificarán la infección de forma espontánea con el paso del tiempo. En otros casos las infecciones serán de carácter persistente con una duración superior a 2 años. De estas últimas, una pequeña proporción progresará hacia neoplasia cervical intraepitelial (LSIL) o a grados superiores de lesiones precancerosas (HSIL) y eventualmente a cáncer de cérvix uterino (Schmitt *et al.*, 2007). Aproximadamente el 50% de los casos de cáncer de cérvix se asocian con el VPH tipo 16, y un 20% adicional con el tipo 18.

Tras la infección natural con VPH, tan sólo el 50% de las mujeres desarrollarán anticuerpos que persistirán a bajas concentraciones y normalmente durante poco más de un año. Así, los anticuerpos producidos tras la infección natural no parecen conferir una protección duradera frente una nueva infección (Viscidi *et al.*, 2004). Por el contrario, la respuesta serológica frente a vacunas de VPH basadas en VLPs de tipos específicos es universal y los títulos de anticuerpos son muy superiores (más de 40 veces) a los generados por la infección natural (Bosch & de Sanjosé, 2007). Todavía no se conoce con exactitud la duración de la protección que conferirán estas vacunas pero los títulos de anticuerpos se mantienen significativamente por encima de los títulos producidos tras la infección natural durante al menos 60 meses después de la vacunación. Así se plantea un nuevo reto en la serología de VPH, relacionado con el establecimiento de nuevas pruebas serológicas eficaces, sensibles, específicas y económicas, que permitan la valoración de la respuesta inmune en los procesos de infección natural y el seguimiento de los títulos de anticuerpos en población vacunada.

El presente trabajo se centró en la expresión de la proteína mayoritaria de la cápsida L1 del VPH tipo 18 en distintos sistemas heterólogos. Se trata del segundo tipo más frecuentemente encontrado en pacientes afectadas de cáncer de cérvix uterino (Bosch & de Sanjosé, 2007). El tipo 18 ha sido incluido en las dos vacunas actualmente comercializadas, Cervarix desarrollada por GlaxoSmithKline y Gardasil desarrollada por Merck.

5.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE L1 DE VPH18 EN *E. coli*

5.2.1 Diseño de las construcciones

En esta aproximación se persiguió la producción de proteínas recombinantes de L1 de VPH18 con una posible aplicabilidad futura en sistemas serológicos para la valoración de la respuesta inmune en población vacunada o en la infección natural.

En primer lugar se realizó el análisis de la estructura de la proteína L1 de VPH18, deducida a partir de su secuencia de aminoácidos (Figura 4.1). Se observó que la región amino-terminal presentaba un fuerte carácter hidrofóbico, y por tanto pocas probabilidades de exponerse en superficie y escaso carácter antigénico, por lo que la expresión de esta región podría resultar poco interesante, teniendo en cuenta además que su carácter hidrofóbico podría favorecer la asociación de la proteína a membranas y la formación de cuerpos de inclusión que dificultarían su posterior purificación. El resto de la proteína presentó un perfil fundamentalmente hidrofílico, especialmente la región carboxi-terminal, caracterizada por su mayor probabilidad de exposición en superficie.

Así se generaron las construcciones: **(1) GST-18L1Ct** (aminoácidos 377 a 568) y **(2) GST-ΔN7118L1** (aminoácidos 72 a 568). La región C-terminal se eligió por las altas probabilidades de exponerse en la superficie de las partículas virales y por su esperado carácter antigénico (Modis *et al.*, 2002). Además, posee varios aminoácidos que son divergentes entre los distintos tipos de VPH por lo que podría ser importante para el reconocimiento por anticuerpos específicos de tipo. También se han descrito anticuerpos monoclonales para el VPH tipo 16 (como el H16V5), que parecen reconocer epítomos específicos de esta región, los cuales podrían ser reconocidos también por sueros humanos reactivos para VPH tipo 16 (Carter *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). En la construcción GST-ΔN7118L1, se decidió omitir la región N-terminal, ya que no parece jugar un papel importante en cuanto al plegamiento de la proteína (Sehr *et al.*, 2002). Chen y colaboradores (Chen *et al.*, 2000) observaron que la delección de hasta 15 aminoácidos del extremo N-terminal (desde la metionina consenso, ver anexo 1) no afectaba al ensamblaje de la proteína L1. La delección de hasta 10 aminoácidos permitía el ensamblaje en VLPs con simetría T=7, en tanto que cuando se delecionaban más, se obtenían las VLPs pequeñas, de simetría T=1 (12 pentámeros y ~32 nm de diámetro). Las delecciones de más de 15 aminoácidos eran inestables por lo que no pudieron ser analizadas. El primer aminoácido que constituye una estructura

secundaria es el residuo 88 (Y=Tirosina) (residuo 27 en la Figura 1.6, referida la metionina consenso), de forma que con la delección realizada en la construcción GST- Δ N7118L1, de 71 aminoácidos si consideramos el primer ATG (10 aminoácidos considerando la metionina consenso), no se vería afectada la estructura secundaria del extremo N-terminal ni su capacidad de ensamblaje con otros monómeros, si bien podría verse afectada la estabilidad de los mismos, ya que la región en cuestión rellena los huecos entre los pentámeros (Modis *et al.*, 2002).

Además, el extremo N-terminal tampoco parece jugar un papel importante en cuanto a la antigenicidad. En el análisis de la secuencia de L1 de 52 VPs de distintas especies se ha observado que existe una homología considerable con la excepción de 5 regiones hipervariables, que están localizadas en lazo en la superficie de la proteína, en los que se han identificado epítomos lineales y conformacionales (Olcese *et al.*, 2004). El primero de estos lazos se corresponde con los aminoácidos 49 a 61 (desde la metionina consenso), 100 a 112 (desde la primera metionina del ORF) en el VPH tipo 16, por lo que no se vería afectado en nuestra construcción delecionada.

Para la expresión de las proteínas recombinantes, se seleccionó el vector pGEX-4T, en el que éstas son expresadas como proteínas de fusión con Glutathione-S-Transferasa (GST) en su extremo N-terminal. En la bibliografía existen algunos trabajos en los que se ha intentado expresar la proteína L1 en otros vectores diferentes para bacterias (Tabla 1.3). Sin embargo los mejores resultados en cuanto a rendimiento y purificación de proteína, se han obtenido con este tipo de vectores. En concreto, Chen y colaboradores (Chen *et al.*, 2001) observaron que cuando la proteína era expresada en el vector pUC, la producción era escasa y además se producía una degradación posterior. La proteína L1 de VPH16 expresada como proteína de fusión con MBP en *L. lactis*, aparecía en la fracción soluble en niveles hasta 9 veces superiores a los de la proteína GST-16L1, sin embargo sólo se lograba purificar, mediante cromatografía de afinidad, un 9,7% del total de proteína expresada (Cho *et al.*, 2007).

5.2.2 Optimización de la expresión

En la Tabla 5.1 se muestra un resumen de las condiciones establecidas como óptimas para la expresión y purificación de las proteínas recombinantes de L1 de VPH18 producidas en *E. coli*.

		Construcción	
		GST-18L1Ct	GST-Δ7118L1
Condiciones de expresión	Medio	SOB	SOB
	D.O. ₆₀₀	0,5	1
	IPTG	0,8 mM	1 mM
	Temperatura	28°C	28°C
	Tiempo	16-20 horas	16-20 horas
Condiciones de purificación	Lisis	Sonicación (Tampón de sonicación B)	Sonicación (Tampón de sonicación B)
	Solubilización fracción no soluble	Tampón de solubilización A	Tampón de solubilización B
	Cromatografía	En suspensión	En columna
	Purificación de eluciones	Electroelución en PBS	Electroelución en PBS y elución en PBS/urea

Tabla 5.1. Resumen de las condiciones óptimas para la expresión y purificación de proteínas de fusión con GST en *E. coli*.

En este trabajo se presenta la optimización de la expresión y purificación de la proteína L1 en *E. coli*. Es ampliamente conocido que la sobreexpresión de proteínas en esta bacteria puede conducir a la formación de cuerpos de inclusión, constituidos por agregados proteicos densos e insolubles (Hober & Uhlen 1999; Marston, 1986). Dada la dificultad para la detección de ambas proteínas recombinantes, mediante el análisis en SDS-PAGE de los extractos crudos de las inducciones realizadas en las condiciones habituales de expresión en este sistema, se pensó que podría estar teniendo lugar la formación de cuerpos de inclusión, no deseables. Por ello se desarrollaron experimentos en los que se modificaron distintos parámetros de la inducción, que se conoce que disminuyen la acumulación de las proteínas en la fracción no soluble en forma de cuerpos de inclusión. Entre estos parámetros se encuentran: la densidad óptica a la que se induce el cultivo, la concentración final de agente inductor, el tiempo de inducción, la temperatura a la cual se induce el cultivo y la aireación. Finalmente, los protocolos de solubilización incorporados al proceso de producción incrementaron la cantidad de proteína recuperada (ver tabla 5.1).

Con respecto a las cepas de *E. coli* empleadas, en la actualidad se dispone de múltiples cepas especialmente diseñadas para la expresión de proteínas heterólogas, que son deficientes en genes que codifican distintos tipos de proteasas citoplasmáticas (Baker *et al.*, 1984; Sugimura & Higashi, 1988). En el presente trabajo se han empleado, la cepa BL21 (deficiente en proteasas OmpT y Lon) que es el hospedador seleccionado para estudios de expresión de proteínas de fusión con GST, y las cepas

C41 (DE3) y C43 (DE3). La cepa C41 es un mutante de la cepa BL21 (DE3) capaz de sobreexpresar una proteína de membrana mitocondrial, que se producía a unos niveles muy bajos en la cepa parental. La cepa C43, es una cepa mutante de la cepa C41, seleccionada por su capacidad para sobreexpresar dos proteínas de membranas en niveles aún superiores a los obtenidos con la cepa parental C41 (Miroux & Walker, 1996). En ambas, los niveles de proteína GST- Δ N7118L1 detectada en la fracción no soluble, tras inducir con los parámetros definidos como óptimos en la cepa BL21, fueron superiores a los observados en ésta última, siendo ligeramente mayores en la C43 (Figura 4.8), coincidiendo con lo publicado para otras proteínas expresadas en dichas cepas (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004).

Las cepas superproductoras, fueron cedidas al final del periodo de investigación y por ello no se optimizó la producción de las proteínas recombinantes en las mismas. En un futuro, para incrementar el rendimiento de producción de la proteína recombinante, sería conveniente abordarla en estas cepas, más en concretamente en la cepa C43.

- También se modificaron las condiciones de expresión, con objeto de mejorar la producción de las proteínas heterólogas. En nuestro caso, la disminución de la temperatura de inducción de 37°C (temperatura óptima de crecimiento de *E. coli*) a 28°C, favoreció considerablemente la expresión de ambas proteínas de fusión. Tras diversos ensayos multifactoriales, se determinó que la inducción era mejor en medio SOB (medio rico en nutrientes, isotónico, diseñado para preparación y transformación de células competentes), que en medio LB (Figura 4.11). Quizá al tratarse de un medio enriquecido, favorezca el crecimiento a densidades superiores con lo que se incrementaría proporcionalmente la cantidad de proteína de fusión expresada y por tanto recuperada al final del proceso de purificación. Se ajustaron las concentraciones óptimas de IPTG y las densidades ópticas del cultivo a las que se realizaba la inducción, incrementándola hasta D.O.₆₀₀ de 1 para la proteína completa, ya que así se reducía la formación de cuerpos insolubles. Además la expresión se mantuvo durante 16-20 horas para incrementar la cantidad de proteína total producida.

- Pero además, dada la dificultad en la detección de las proteínas de interés, especialmente de la proteína GST- Δ N7118L1 en los extractos crudos mediante análisis por SDS-PAGE, se llevó a cabo lisis y separación de fracciones de los cultivos inducidos, para tratar por separado la fracción no soluble, donde se encontraba la mayor parte de la proteína recombinante.

Para realizar la lisis se utilizaron dos métodos, uno basado en detergentes no iónicos (B-PER) y otro en la sonicación. Tras la ruptura, en los geles de poliacrilamida las proteínas recombinantes aparecían en la fracción no soluble (Figura 4.19), observándose una mejor recuperación cuando la lisis se llevaba a cabo mediante sonicación. Éste es un método más agresivo que puede favorecer la disgregación de los agregados proteicos, si bien tiene como inconveniente la posibilidad de degradación de la proteína si el método no es aplicado correctamente. El método comercial B-PER inicialmente fue descrito para la extracción de proteínas solubles. Incluso en algunos trabajos se lisan las células por sonicación en B-PER, o es utilizado una vez generados esferoplastos en levaduras (DeLong *et al.*, 2004; Feissner *et al.*, 2006). Por tanto parece que no es un método muy eficaz, al menos cuando se trabaja con proteínas poco solubles.

Puesto que ambas proteínas de fusión aparecían mayoritariamente en la fracción no soluble (Figura 4.9) se decidió realizar algunas aproximaciones para solubilizar los cuerpos de inclusión. Así, para favorecer la liberación y disgregación de los mismos, se llevó a cabo la lisis en presencia de detergentes y agentes reductores (SDS, Tween y DTT) y puesto que la proteína seguía apareciendo en la fracción no soluble, ésta se sometió a tratamiento con distintos tampones de solubilización antes de ser sometida a purificación mediante cromatografía de afinidad. Se probaron distintos tampones de sonicación (Tabla 3.9), y distintos tampones de solubilización (Tabla 3.10) basados en la combinación de detergentes y agentes reductores. El mejor rendimiento, se obtuvo cuando la lisis se realizaba en tampón de sonicación B conteniendo lisozima y agentes reductores como DTT y EDTA.

- Tras la lisis y separación de fracciones, la fracción no soluble se solubilizó en Tampón de solubilización A (construcción GST-18L1Ct) o Tampón de solubilización B (GST-ΔN7118L1) (Tabla 3.10). Ambos contienen detergentes como el Tween20 y el SDS. El tampón B además contiene el agente reductor DTT. La fracción no soluble solubilizada se sometió a purificación mediante cromatografía de afinidad, en suspensión (GST-18L1Ct) o en columna (GST-ΔN7118L1).

Es de destacar que, si bien para la purificación de la proteína GST-ΔN7118L1 se empleó la cromatografía de afinidad en columna, para tratar de recuperarla de forma más pura, y aplicando el protocolo descrito en el procedimiento A por ser el menos agresivo, al final del proceso se apreció la coprecipitación de una proteína de 60 KDa (Figura 4.12, A), que podría corresponder a la chaperona GroEL de *E. coli*, implicada

junto con GroES en el plegamiento de muchas proteínas (Chen & Sigler, 1999; Chen *et al.*, 2001, Weissman *et al.*, 1994, 1995), y que también se observó en los ensayos de inmunodetección de la proteína GST-18L1Ct purificada (Figura 4.25).

- Dadas las observaciones anteriores, se aplicaron distintos protocolos basados en el trabajo de Chen y colaboradores (Chen *et al.*, 2001) sobre la expresión de la proteína L1 de los tipos de VPH 16 y 11 en *E. coli*. En este trabajo, la eliminación de la chaperona se realiza mediante la adición de urea a concentración 3,5M, que se sabe que es capaz de desensamblar los heptámeros dobles que conforman la chaperona GroEL, y sin embargo no afecta a la formación de pentámeros por parte de la proteína L1. Pero la adición sólo de urea reduce a la mitad la presencia de GroEL, en tanto que el tratamiento previo de los lisados con ATP y MgCl₂, seguido de incubación con urea, conseguía eliminar básicamente el 100% de la chaperona.

Pero la aplicación exacta de las condiciones descritas en el trabajo mencionado (Procedimiento D en nuestro caso), se tradujo en la presencia de múltiples bandas en las eluciones, además de la correspondiente a la proteína GST-ΔN7118L1, con una clara disminución de la intensidad de ésta en comparación con la obtenida en el experimento realizado en paralelo con las condiciones del procedimiento A (Figura 4.12).

El fallo en la aplicación del método, podría deberse a diferencias metodológicas con el trabajo publicado (tipo de medio, condiciones de aireación que determinan la formación de cuerpos de inclusión en mayor o menor medida, condiciones de inducción o tipo de columnas). Además, dicho trabajo es aplicado a los tipos 16 y 11 que generalmente se expresan mejor que el tipo 18, que presenta un carácter más insoluble, como hemos observado comparando con otros trabajos realizados con el tipo 16 en el laboratorio (Bosch, 2008).

Por tanto, debieron diseñarse modificaciones sobre el protocolo descrito para adaptarse a las condiciones de cultivo y expresión de la proteína GST-ΔN7118L1 (Figura 4.12). La primera modificación consistió en la aplicación del tratamiento con ATP y MgCl₂ y urea a la fracción no soluble, en lugar de al lisado (procedimiento C), puesto que la proteína de fusión, a diferencia de la proteína L1 de VPH16, seguía apareciendo de forma mucho más abundante en la fracción no soluble, aún cuando la inducción se realizaba a 28°C. En las eluciones se encontró una banda tenue de peso molecular próximo al de nuestra proteína de fusión, y múltiples bandas adicionales (Figura 4.12, C).

En el procedimiento B, se incorporó urea en el tampón de solubilización y en los lavados de la columna, pero no se obtuvo ninguna banda en las eluciones, en tanto que una banda que podría corresponder con la proteína, aparecía en el primer lavado con urea de la columna, probablemente por la disminución de la capacidad de unión de la sefarosa en presencia de este agente.

Ante la dificultad para la eliminación de la chaperona contaminante, se optó por el procedimiento A (basado en solubilización en presencia de detergentes y agentes reductores, pero sin urea), que permitía recuperar mayor cantidad de proteína recombinante, aunque con la proteína de 60 KDa coeluyente.

- Se realizó entonces un proceso para la eliminación de la proteína contaminante de las eluciones de la columna. Así, éstas se resolvieron mediante SDS-PAGE, y el gel se sometió a una tinción reversible con KCl 0,25 M frío, que permite la observación de las proteínas que se encuentran en elevada concentración. Esta técnica pudo ser aplicada sólo gracias a la optimización de la expresión y de la solubilización de las proteínas. La banda correspondiente a la proteína de interés (GST-18L1Ct o GST- Δ N7118L1) pudo ser escindida con un bisturí y sometida a electroelución, o elución en PBS suplementado con urea. Este tratamiento con urea se realizó pensando que quizá podría favorecer la liberación de proteína GroEL que pudiera permanecer acomplexada a la proteína de fusión aún tras la separación electroforética. Tras el análisis de la proteína eluida o electroeluida en PBS, mediante SDS-PAGE, se observó una única banda (Figura 4.13). Hay que destacar, que la proteína eluida en presencia de urea presenta, tanto en SDS-PAGE (Figura 4.13) como en WB (Figuras 4.15; 4.17 y 4.19), un peso molecular aparente ligeramente menor que el de la proteína purificada en PBS. Este fenómeno, probablemente sea debido a los cambios conformacionales producidos por la urea, ya que dicho compuesto promueve la desnaturalización de las proteínas por cambios directos e indirectos (Benion & Daggett, 2003).

Al final del proceso de purificación se obtuvo un rendimiento de 1,2 mg de proteína por litro de cultivo inducido para la proteína GST-18L1Ct y de 1 mg de proteína por litro de cultivo inducido para GST- Δ N7118L1. El rendimiento obtenido para las proteínas recombinantes, es muy variable y depende de su propia naturaleza, de las células en las que se produce, y de las condiciones en las que tiene lugar la expresión y purificación de la misma. El rendimiento de las proteínas de fusión se encuentra en un intervalo comprendido entre 1 y 10 mg/L de cultivo (Smith *et al.*, 1990). Así, en nuestro caso, estamos en unos niveles de rendimiento bajos, comparando con el obtenido para

proteínas solubles, aunque las condiciones aplicadas han incrementado considerablemente la producción.

5.2.3 Caracterización inmunológica de las proteínas recombinantes

- En primer lugar se llevó a cabo la caracterización inmunológica de las proteínas recombinantes mediante análisis por *Western blot* (WB), empleando para ello sueros comerciales y sueros animales.

Las bandas correspondientes a las proteínas recombinantes en cada paso de la purificación, al igual que al final de la misma (Figura 4.16), fueron reconocidas por el anticuerpo anti-GST, apareciendo una banda muy intensa. Se corroboró así que las proteínas de fusión se habían producido correctamente, de forma que la proteína GST presentó epítomos lineales tras la separación en SDS-PAGE que eran perfectamente reconocidos.

Además la proteína GST- Δ N7118L1 también fue reconocida, incluso tras la elución en PBS suplementado con urea 3,5M, por los anticuerpos anti-VPH comerciales, IH8 y HPV-4C4, siendo la intensidad de la señal mayor en el caso del primero, lo cual en principio parece lógico, puesto que se trata de una mezcla de anticuerpos (Figura 4.17). Sin embargo, la proteína GST-18L1Ct no fue reconocida por ninguno de estos anticuerpos comerciales. Esto puede ser debido a que estén reconociendo epítomos localizados en una región diferente a la carboxi-terminal de la proteína. El alineamiento de las proteínas L1 de 52 VP de diferentes especies mostró que existe una homología considerable excepto en 5 regiones hipervariables, de 10-30 aminoácidos de longitud, localizadas en lazos interlaminares expuestos en la superficie. Estos lazos son altamente inmunogénicos y por lo tanto pueden poseer epítomos determinantes de especificidad de tipo (Olcese *et al.*, 2004). Cuatro de estas regiones hipervariables (lazos B-C, D-E, E-F y F-G, Figuras 1.6 y 1.7 A), están localizadas en la mitad N-terminal de la proteína, no contenida en la construcción GST-18L1Ct, y podrían aportar epítomos que sean reconocidos por los anticuerpos comerciales empleados, y que no estarán presentes en la proteína truncada (GST-18L1Ct).

- La limitada disponibilidad de anticuerpos anti-VPH comerciales al comienzo de la investigación, hizo necesaria la obtención de sueros hiperinmunes frente a los antígenos producidos, para disponer de controles positivos en las técnicas de inmunodetección.

Dadas las dificultades para producir la proteína L1 completa, y dado que se conocía el carácter antigénico de la región C-terminal de la proteína L1, se llevó a cabo la inmunización de ratones con la proteína GST-18L1Ct. Los sueros obtenidos se mostraron reactivos a todas las proteínas producidas en el trabajo (Figuras 4.18 y 4.19). Por tanto, se trata de sueros policlonales que presentan anticuerpos frente a la proteína GST [puesto que reaccionan fuertemente frente a dicha proteína producida en el laboratorio (Figura 4.16), frente a GST comercial (Figura 4.19) y frente a la proteína L1 de VPH16 producida también como proteína de fusión con GST (Figura 4.22)], y anticuerpos frente a la proteína L1 de VPH18 [dado que reconocen la proteína Δ N6118L1 (Figura 4.20), producida en células de insecto, que no está fusionada a GST].

- Pero además, ante la posibilidad de que sólo se produjeran anticuerpos frente a epítopos lineales, ya que la inmunización se realizó con la proteína electroeluida en PBS y por tanto desnaturalizada, se optó por probar la inmunización de ratones con ADN.

Se realizaron dos aproximaciones, una en la que se administraban tres dosis de 100 μ g de ADN plasmídico por vía intramuscular, y una segunda en la que se empleó el protocolo descrito por Bates y colaboradores en el año 2006 (Bates *et al.*, 2006) administrándose 20 μ g de ADN plasmídico en cada inoculación, vía intravenosa. En ninguno de los dos casos los sueros recogidos tras la inmunización se mostraron reactivos frente a las proteínas producidas (GST- Δ N7118L1 o Δ N6118L1, Figura 4.22).

La inmunización de ratones con ADN de VPH 16 y 11 para la generación de sueros hiperinmunes ya ha sido desarrollada por varios autores (Leder *et al.*, 2001; Mossadegh *et al.*, 2004; Sehr *et al.*, 2002). En el trabajo pionero, desarrollado por Leder y colaboradores, cuando empleaban la secuencia del gen *l1* silvestre, tan sólo dos de cinco ratones desarrollaban respuesta de anticuerpos, mientras que cuando modificaban la secuencia para adaptarla a la frecuencia de utilización de codones de células de mamífero, el 100% de los ratones inmunizados presentaban respuesta de anticuerpos con títulos elevados. Además se indicaba que, probablemente estos cambios introducidos conducían a la inactivación de los elementos reguladores negativos de la transcripción conocidos y no conocidos del ORF para L1. En la misma línea se sitúa el trabajo de Mossadegh y colaboradores, en el que sólo cuando adaptaban los codones a los usados en mamíferos conseguían respuesta inmune humoral en ratones inmunizados

con el ADN para L1 de VPH11. Sin embargo, no existe ningún trabajo relacionado con la inmunización con el ADN que codifica la proteína L1 de VPH18.

Además cabe destacar que el ADN se clonó a partir de la primera metionina del ORF. Empíricamente se ha demostrado que sólo cuando se utilizaba la metionina consenso para VPH16 como ATG de inicio de la traducción, se obtenían VLPs en grandes cantidades (Kirnbauer *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1990). Sin embargo, no fue hasta 2005 cuando esta posibilidad se recogió en un trabajo, en el que además se analizaron las metioninas presentes en los ORFs de otros tipos de VPH, incluido el tipo 18, en el que se define como metionina consenso, la tercera (Webb *et al.*, 2005), a pesar de que en los bancos de datos sigue figurando como primer ATG el de la posición 5430 que corresponde a la posición 1 del alineamiento (Anexo1). Así pudo ocurrir que, aún cuando se hubiesen producido bajos niveles de traducción, ésta no haya dado lugar a proteína capaz de plegarse adecuadamente y por tanto no se hayan producido anticuerpos tras la inmunización.

Por último, la administración por vía intravenosa (vena lateral de la cola) resultó una técnica muy laboriosa, por lo que en algunas de las inoculaciones el animal no recibió la dosis completa, lo que también podría haber contribuido al fracaso de la inmunización.

- Las proteínas recombinantes fueron enfrentadas a sueros humanos en WB, y ante la ausencia de un panel de sueros caracterizados, se emplearon plasmas de hemodonantes y sueros de pacientes caracterizados genéticamente como infectados y no infectados, con objeto de determinar si contenían anticuerpos que pudieran reconocer epítomos presentes en las proteínas de fusión. Como se indicó en la introducción, en el año 2001, la OMS inició un programa para el establecimiento de reactivos de referencia, tanto para la detección genética como serológica de VPH. En lo referido a la serología, en el único trabajo internacional coordinado por la OMS, se observó una variabilidad interlaboratorio considerable en el establecimiento de los niveles de anticuerpos de las muestras analizadas, que incluían sueros de mujeres no infectadas, de mujeres que habían adquirido la infección de forma natural y de individuos inmunizados con diferentes prototipos de vacuna (Ferguson *et al.*, 2006). La posibilidad de establecer sueros de referencia frente a los distintos tipos de VPH para estandarizar y validar los diferentes métodos de detección de anticuerpos específicos frente al VPH, constituye otro de los objetivos planteados por la OMS.

▪ Es importante destacar que en la actualidad, no se han publicado trabajos en los que se analice la reactividad frente a VPH de sueros humanos, empleando la técnica de WB, sino que todos los estudios sobre serología de VPH se han centrado en la técnica de ELISA, y también algunos en ensayos de neutralización, por lo que no se han podido realizar estudios comparativos. No obstante, se ha descrito que la proteína L1 desnaturalizada es reconocida en ELISA por sueros humanos de pacientes infectados con VPH, cuando era producida como proteína de fusión con colas de polihistidina en *E. coli* (Di Bonito *et al.*, 2006).

Los primeros ensayos se realizaron empleándose las proteínas de fusión purificadas por cromatografía de afinidad en suspensión y electroelución (proteína GST-18L1Ct) y mediante electroelución directa desde la fracción no soluble (proteína GST-ΔN7118L1). Aparentemente, no existió reconocimiento de la proteína GST-18L1Ct, mientras que algunos sueros parecieron reconocer la proteína de fusión correspondiente a la L1 completa GST-ΔN7118L1 (Figura 4.23), donde se reconocían tres bandas, siendo dos de los sueros con aparente reconocimiento, de hemodonante y de paciente caracterizado genéticamente como no infectado por VPH de alto riesgo. Así ante la posibilidad de que la proteína no estuviese suficientemente purificada, se realizó un nuevo ensayo, empleando la proteína GST-ΔN7118L1 purificada mediante cromatografía de afinidad en columna, y posterior electroelución y elución en urea 3,5M. En este caso, los sueros que reaccionaron frente a la proteína de fusión reconocieron dos bandas tras el revelado. La segunda banda de menor peso molecular podría ser debida a degradación de la proteína, puesto que el grosor de la banda de anti-GST, y de los sueros animales, hacían sospechar que ambas eran reconocidas por dichos anticuerpos (Figura 4.24). La aparición de bandas de peso molecular inferior al esperado ya ha sido indicada con anterioridad cuando la proteína L1 de VPH11 era expresada en *S. cerevisiae* (Cook *et al.*, 1999). En este caso, varios de los sueros humanos que parecieron reconocer la proteína expresada fueron sueros aparentemente negativos (sueros y plasmas de hemodonantes, y suero de un paciente caracterizado genéticamente como no infectado por VPH de alto riesgo). Es importante destacar que, a diferencia de otras infecciones, los hemodonantes no están sometidos a control de la infección por papilomavirus, y que los pacientes caracterizados genéticamente como no infectados por VPH de alto riesgo, pueden ser pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico para eliminar una infección previa, pacientes con una infección causada por tipos no detectados con la técnica diagnóstica empleada, o con infecciones recientemente

aclaradas frente a las que se hayan producido anticuerpos. Cabe incluso la posibilidad de que pueda existir una infección por VPH18 en otras localizaciones sin que se detecte ADN en muestras de cepillado cervical. Por tanto, en cualquiera de estos casos es posible la presencia de anticuerpos anti-VPH.

Por otro lado, se encontraron algunos sueros de pacientes caracterizados genéticamente como infectados con VPH, como por ejemplo el suero GP3 (Figura 4.23), que no se mostraron reactivos en WB frente a la proteína recombinante. Como ya hemos comentado los niveles de anticuerpos en suero tras la infección natural, son bajos incluso cuando alcanzan el pico (Villa *et al.*, 2005), de forma que pueden ser indetectables en función de la sensibilidad del método serológico empleado. Por otro lado, cuando la infección evoluciona hacia HSIL y cáncer, no existe expresión de proteínas virales tardías (L1 y L2), siendo sin embargo la expresión de la proteína E7 detectable a lo largo de todos los estratos del epitelio mucoso (Doorbar *et al.*, 2007, Peh *et al.*, 2002). Así, si este fuera el caso, al no existir expresión de proteínas estructurales, puede que la respuesta humoral, se dirija preferentemente hacia las proteínas tempranas, asociándose este tipo de respuesta con la progresión maligna de la enfermedad. Determinados estudios empleando como antígenos proteínas recombinantes, han mostrado que el 50-60% de pacientes con cáncer cervical presentan anticuerpos anti-E6 y anti-E7 (Meschede *et al.*, 1998). En la misma línea se sitúan otros trabajos con proteínas recombinantes, en los que los sueros procedentes de pacientes positivos para ADN de VPH no reconocieron la proteína L1 en ELISA, pero sí otras proteínas como L2 ó E7 (Di Bonito *et al.*, 2006).

El último análisis por WB, pretendió determinar la especificidad del reconocimiento obtenido por sueros humanos, realizando un experimento de doble inmunodetección con una mezcla de sueros humanos positivos y negativos ya analizados anteriormente, y anticuerpos comerciales y sueros hiperinmunes de ratón (Figura 4.25). Los sueros positivos reconocieron bandas correspondientes a la proteína recombinante GST-ΔN7118L1 claramente, y de forma dudosa la correspondiente a la proteína GST-18L1Ct (Figura 4.23). Para la proteína completa (Figura 4.25 A, calle 2 y 3) se reconocieron claramente dos bandas, pero sólo la banda de menor peso molecular (proteína en PBS) y la de mayor peso molecular (proteína en PBS/urea) fueron reconocidas por anti-GST. El cóctel IH8 reconoce una banda muy gruesa que podría corresponder a las dos anteriores juntas, por lo que quizá la falta de reconocimiento por GST en las dos bandas podría explicarse por problemas en la eliminación de anticuerpos

o bien porque se trate de proteínas contaminantes de *E. coli*, reconocidas por los sueros humanos. La mezcla de sueros negativos, no pareció mostrarse reactiva a ninguna de las tres proteínas recombinantes.

Finalmente, cabe destacar en este ensayo que tanto sueros negativos como sueros positivos, reaccionaron intensamente con una proteína de peso molecular aparente de 60 KDa (señalada con flechas negras, Figura 4.25 A y B), que no era reconocida por anti-GST ni por el cóctel IH8, que podría ser una vez más la correspondiente a la chaperona de *E. coli* GroEL. Esta banda apareció en las muestras correspondientes a las proteínas purificadas en PBS, en tanto que no apareció en la proteína eluida en PBS/urea. Por tanto el proceso final de purificación de las eluciones obtenidas en la cromatografía de afinidad permite eliminar proteínas contaminantes altamente reactivas para su utilización en WB. Puede que este agente desnaturalice la proteína GroEL que aparentemente está coeluyendo acomplexada con nuestra proteína de fusión, de forma que tras la centrifugación no sea recuperada, o sea recuperada en pequeñas cantidades, no siendo reconocida posteriormente por los sueros en WB.

- Con objeto de determinar si las proteínas recombinantes podían presentar epítopos conformacionales que fuesen reconocidos por sueros humanos, se desarrolló la inmunodetección mediante ELISA, técnica ampliamente utilizada dada su sencillez, la capacidad de evaluación de numerosas muestras en un mismo ensayo, su sensibilidad y especificidad (una vez optimizada) así como la posibilidad de automatización de la misma. Las inmunodetecciones se desarrollaron con la proteína GST-ΔN7118L1 purificada en PBS o en PBS/urea. Conviene destacar que el objetivo de estos ensayos no consistió en ningún momento en la estandarización del método de ELISA, debido fundamentalmente a la carencia de un panel de sueros tanto positivos como negativos bien caracterizados.

En primer lugar los antígenos fueron enfrentados a los sueros hiperinmunes de ratón, y a los sueros comerciales, tanto anti-GST como IH8. Se observó en todos los casos, un aumento de los valores de absorbancia, a medida que aumentaba la concentración de antígeno por pocillo (Figura 4.26), con unos ratios (sueros positivos/sueros negativos) muy elevados para todas las combinaciones ensayadas (Tabla 4.1). En el caso de los sueros preinmunes de ratón, los valores de absorbancia no variaban al aumentar la concentración de antígeno y fueron siempre muy próximos a cero. Estos resultados indicaban una respuesta específica. Estos mismos ensayos se realizaron con sueros de pacientes genéticamente caracterizados como infectados con al

menos VPH18, observándose la misma tendencia de los valores de absorbancia de los sueros respecto a la concentración creciente de proteína (Figura 4.27).

Para los siguientes ensayos se utilizaron placas Polysorp, que unen fundamentalmente residuos hidrofóbicos, coincidentes con la naturaleza de la proteína recombinante producida. Los pocillos se sensibilizaron con 300 ng de proteína, concentración compatible con la empleada en el único trabajo en el que se han usado también proteínas recombinantes producidas en *E. coli* y desnaturalizadas en presencia de urea (Di Bonito *et al.*, 2006). La dilución de los sueros humanos utilizada fue 1:50, que se encuentra dentro del rango de diluciones descritas en la literatura que oscila entre 1:20 y 1:100 (Di Bonito *et al.*, 2006; Studentsov *et al.*, 2002; Studentsov *et al.*, 2003, Karem *et al.*, 2002). Se observó discriminación entre los sueros definidos como negativos, y los sueros definidos como positivos, a excepción de una única muestra, correspondiente a un paciente genéticamente caracterizado como no infectado con VPH de alto riesgo (Figura 4.28). Esta muestra presentó un valor de absorbancia muy superior al del valor de corte (establecido en 0,58 y 0,39 para las proteínas en PBS y urea respectivamente) en los dos ensayos.

En el futuro, será necesario repetir estos ensayos empleando un mayor número de sueros bien caracterizados. Además, quizá fuese conveniente el diseño de un ELISA de captura, para evitar la interferencia que la proteína GST pueda tener en los resultados observados. Este tipo de enzimoimmunoensayo ya ha sido desarrollado por Sehr y colaboradores (Sehr *et al.*, 2002). En él, las proteínas L1 de los tipos de VPH6, 16, y 18 (carentes de los 10 primeros aminoácidos) son expresadas como proteínas de fusión con GST en el extremo N-terminal, y con una cola de 11 aminoácidos de SV40 en el C-terminal. Su antigenicidad fue analizada en un tipo de ELISA en el que los antígenos se capturan usando moléculas de glutation-caseína. Así se captan las moléculas recombinantes GST-L1 directamente desde los lisados bacterianos.

Dadas las dificultades en la valoración de sistemas serológicos empleando sueros humanos procedentes de infección natural con VPH, la disponibilidad futura de sueros de población vacunada, en los que los títulos de anticuerpos se sitúan en torno a 40-100 veces superiores a los generados por infección natural (Bosch & de Sanjosé, 2007; Harper *et al.*, 2004), abre nuevas puertas a la caracterización inmunológica de los distintos antígenos recombinantes producidos. A pesar de todo, parece que los sueros humanos podrían estar reconociendo epítomos, fundamentalmente lineales, y/o

Discusión

conformacionales, de las proteínas de fusión producidas, tanto en WB como en ELISA, y epítomos conformacionales, en las VLPs.

5.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE L1 DE VPH18 EN *P. pastoris*

El sistema basado en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* como sistema de producción de VLPs y proteínas recombinantes ha sido seleccionado por varias razones. *P. pastoris* es una levadura metilotrófica facultativa perteneciente al grupo de los ascomicetos, que se reproduce por gemación, homotámica, y cuya dotación genómica permanece haploide salvo que sea sometida a condiciones limitantes, generalmente a limitación de la fuente de nitrógeno (Cereghino & Cregg, 2000). Hace casi 40 años que Koichi Ogata describió la capacidad de ciertas especies de levaduras para usar el metanol como fuente de carbono y energía (Ogata *et al.*, 1969). Los organismos metilotrofos atrajeron la atención inmediata y durante los últimos 15 años, *P. pastoris* se ha erigido como un sistema próspero para la producción de cantidad de proteínas heterólogas. La popularidad creciente del sistema puede atribuirse a múltiples factores, entre ellos: (i) su manipulación molecular muy simple y muy semejante a la de *S. cerevisiae*, uno de los sistemas experimentales mejor caracterizados de la biología moderna, (ii) su capacidad para producir proteínas heterólogas a elevados niveles tanto intra como extracelularmente, (iii) la escasa secreción de proteínas al medio que simplifica el proceso de recuperación y purificación de proteínas heterólogas, (iv) la existencia de múltiples modificaciones post-traduccionales, que se asemejan más a las de organismos eucariotas superiores que las realizadas por *S. cerevisiae*. Además, no hiperglicosila y no genera residuos tipo α 1,3-manosa, principal causante de la naturaleza antigénica de las glicoproteínas expresadas en *S. cerevisiae* y que dificultan su uso terapéutico (Cregg *et al.*, 1993), (v) presenta fundamentalmente metabolismo de tipo respiratorio, a diferencia de *S. cerevisiae*, con lo que puede crecer hasta alcanzar densidades celulares extremadamente elevadas.

El concepto del uso de *P. pastoris* como sistema de expresión heterólogo surge por el hecho de que algunas de las enzimas necesarias para el metabolismo del metanol aparecen en niveles elevados, sólo cuando las células crecen en presencia de dicho alcohol. La enzima alcohol oxidasa (AOX) cataliza el primer paso en la vía de utilización del metanol en el interior del peroxisoma. Existen dos genes que codifican la AOX en esta levadura: *aox1* y *aox2*, regulados a nivel de transcripción (Cregg *et al.*, 1988), siendo el gen *aox1* el responsable de la síntesis del 90% de la AOX, mientras que el gen *aox2* codifica el 10% restante (Cregg & Madden, 1989). La elevada tasa de transcripción del gen *aox1* es una de las características por las que es el promotor más

ampliamente utilizado en la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*, junto con su regulación, de forma que en presencia de metanol, los niveles de ARNm para la AOX son de un 5% del total de poliA-ARNm. Sin embargo, en presencia de otras fuentes de carbono, los niveles son casi indetectables (Cregg & Madden., 1988).

El sistema de *P. pastoris* ha sido empleado para la expresión de distintas proteínas virales, entre ellas, proteínas de cápsidas como por ejemplo proteínas de la cápsida del virus del dengue, de los virus de la hepatitis B y C, Norovirus y del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (Acosta-Rivero *et al.*, 2004; Farnós *et al.*, 2005; Martínez-Donato *et al.*, 2006; Sugrue *et al.*, 1997; Watelet *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2007).

Por otro lado, la proteína L1 de distintos VPH ha sido producida en la levadura *S. cerevisiae* (Tabla 1.3). En estos trabajos, la proteína L1 (o las proteínas L1 y L2) son expresadas bajo la acción del promotor P_{GAL10}, fuertemente inducible mediante la adición de galactosa al medio. Este promotor, como el de la alcohol oxidasa en *Pichia*, también permite alcanzar elevadas densidades celulares. En todos los trabajos se observó el ensamblaje de la proteína L1 en forma de VLPs. Existe un único trabajo, de escasa repercusión por su publicación en una revista china, en el que se describe la producción de la proteína L1 de VPH6 en *P. pastoris* (Tabla 1.3) y que discutiremos más adelante.

5.3.1 Diseño de las construcciones

Se persiguieron dos objetivos: (1) la expresión de la proteína L1 como proteína de secreción, para lo cual era preciso fusionarla a la señal de secreción nativa del factor α en su extremo N-terminal, incluyendo también una fusión al epítipo *c-myc* en su extremo C-terminal con objeto de facilitar su detección y purificación (construcción **18L1Z α**); (2) expresión de la proteína en forma nativa para la generación de VLPs. En este caso, se realizaron dos construcciones, una a partir de la primera metionina del ORF para L1 proporcionado por las bases de datos (construcción **18VLPZ**) y otra a partir de la tercera metionina o metionina consenso (construcción **Δ N6118VLPZ**).

- Para llevar a cabo nuestros objetivos, se emplearon los vectores pPICZ α (construcción con señal de secreción) y pPICZ (construcción para producción de VLPs) en los que la expresión del gen de interés se sitúa bajo la acción del promotor que codifica la alcohol oxidasa 1 (AOX1), que en presencia del agente inductor (metanol), posee una elevada tasa de transcripción superior a la de otros promotores disponibles en

sistemas comerciales en el mercado. Además estos vectores portan como marcador de selección el gen *Sh ble* (375 pb) que codifica una proteína que confiere resistencia a la bleomicina zeocina, efectiva en *E. coli*, levaduras y otros eucariotas (Gatignhol *et al.*, 1988). Así estos vectores presentan la ventaja adicional de permitir la selección directa de los clones recombinantes tanto en *E. coli* como en *P. pastoris*, en medio de cultivo suplementado con el antibiótico.

Para las construcciones **18L1Za** y **18VLPZ**, el ADN molde se obtuvo a partir del ADN extraído de una muestra cervical de un paciente infectado con VPH18, ya que igual que sucedió con las construcciones realizadas en *E. coli*, en ese momento no se disponía de vectores comerciales conteniendo el ADN de VPH18. Durante el proceso de amplificación por PCR, en los oligonucleótidos directos se introdujeron modificaciones sobre la secuencia original (cuatro cambios, Figura 4.33), para adaptarla a la secuencia de Kozak descrita para levaduras (A/YAA/TAATGTCT) (Romanos *et al.*, 1992). Cuando se realizó la construcción **ΔN6118VLPZ**, ya se disponía del vector de la ATCC conteniendo el ADN de VPH18 clonado en el mismo, que fue empleado para obtener la construcción correspondiente, aunque en este caso no se modificó el entorno ATG.

- Se seleccionó la electroporación como método de transformación de levaduras. La generación de esferoplastos no resultaba conveniente puesto que no permite la selección directa de clones recombinantes en presencia de Zeocina, ya que el daño producido a la pared celular lleva a un incremento en la sensibilidad del antibiótico. Además, la mayor frecuencia de transformación y de fenómenos de aislamiento de clones multicopia se da cuando se emplea la electroporación como método de transformación.

Las cepas de *P. pastoris* GS115 y X-33 (fenotipo Mut⁺), y la cepa KM71H (fenotipo Mut^s) son las más utilizadas para la expresión de proteínas heterólogas. Se seleccionó la cepa X-33 para fenotipo Mut⁺, por ser una cepa con fenotipo silvestre y por tanto con escasos requerimientos nutricionales, y la cepa KM71H, de fenotipo AOX1 mutante, puesto que algunas veces estas cepas son mejores productoras de proteínas heterólogas y además al expresar la proteína alcohol oxidasa en menores niveles, la proteína heteróloga se puede purificar más fácilmente, cuando se trata de una proteína expresada intracelularmente (Cregg *et al.*, 1987; Chiruvolu *et al.*, 1997; Milek *et al.*, 2000; Reverter *et al.*, 1998; Sreekrishna *et al.*, 1997; Swiatek *et al.*, 2000; Tschopp *et al.*, 1987). Sin embargo, la cepa en la que se obtienen mayores niveles de expresión ha de ser comprobada para cada caso particular. Por ello ambas (X-33 y

KM71H) se transformaron con las construcciones 18VLPZ y 18L1Z α . Para la construcción Δ N6118VLPZ, se transformó sólo la cepa X-33.

- El siguiente paso consistió en la determinación del fenotipo Mut de los clones recombinantes para las distintas construcciones obtenidos en la cepa X-33. Como ya se ha descrito, se pueden producir fenómenos de recombinación doble entre las regiones homólogas del vector pPICZ o pPICZ α y el genoma de la levadura. Dichos fenómenos no son muy habituales, y se estima que la frecuencia de los mismos es del 10-20% (Cereghino & Cregg, 2000). El resultado es la sustitución del gen *aox1* por el casete de expresión. Este tipo de recombinación fuerza a la célula a depender de la transcripción débil del gen *aox2* para crecer en presencia de metanol (Cregg *et al.*, 1987). Como resultado, el clon en el que se produzcan recombinaciones dobles, adquirirá fenotipo Mut^s. Dado que estas cepas metabolizan el metanol más lentamente, y que la acumulación de éste en el medio de crecimiento puede resultar tóxica, la adición de metanol para la inducción de los cultivos debe hacerse de forma diferente a las cepas Mut⁺. Por ello este paso de comprobación del fenotipo Mut resultó de gran importancia. En nuestro caso no se obtuvo ningún clon en el que se hubiesen producido fenómenos de recombinación doble (Figura 4.34), ya que todos los clones de la cepa X-33 presentaban fenotipo Mut⁺.

- Se ha descrito que los clones recombinantes que presentan hiper-resistencia a los antibióticos, pueden corresponderse con clones que contienen múltiples copias del casete de expresión, que se traducen en un incremento de los niveles de ARNm en la célula y en una mayor producción de la proteína en cuestión (Cereghino & Cregg, 2000; Cos *et al.*, 2005), si bien, el número óptimo de genes que aportan la máxima cantidad de ARNm (o la máxima cantidad de proteína) parece ser particular de cada caso (Thill *et al.*, 1990). Por ello, se plaquearon los clones recombinantes de las construcciones 18VLPZ y 18L1Z α en concentraciones de hasta 500 μ g/ml de zeocina. En este caso, se observó una reducción del número de clones totales capaces de crecer a dicha concentración del antibiótico (Tabla 4.2). Dado que en la bibliografía se emplean concentraciones superiores de zeocina para la selección de clones recombinantes (Romanos *et al.*, 1998), para la construcción delecionada (Δ N6118VLPZ), se emplearon concentraciones de hasta 2000 μ g/ml (Tabla 4.2), obteniéndose 12 clones con resistencia a la dosis máxima del antibiótico. Sin embargo, también se ha descrito que muchos de los clones resistentes a dosis elevadas de zeocina, no contendrán copias

múltiples del casete de expresión, precisándose el análisis de numerosos clones transformantes para detectar los multicopia (Cereghino & Cregg, 2000).

5.3.2 Ensayos de expresión

- Para los ensayos de expresión, exceptuando los realizados en la construcción $\Delta N6118VLPZ$ en los que se emplearon los medios MGY y MM, se utilizaron los medios de cultivo BMGY (acumulación de biomasa) y BMMY (inducción de la expresión), puesto que se trata de medios tamponados, que mantienen el pH en torno a 6, lo que resulta especialmente interesante para la construcción de secreción, ya que se ha descrito que la proteína L1 ensambla preferiblemente a pH inferior a 7 (Casini *et al.*, 2004). Las primeras aproximaciones se realizaron mediante inducción en erlenmeyer, con concentraciones de metanol 0,5 ó 1%, que son las empleadas comúnmente (Daly & Hearn, 2005). Tras el análisis en SDS-PAGE de los sobrenadantes de los cultivos inducidos (proteína de secreción 18L1Z α), o de los lisados celulares en el caso de las construcciones para expresión nativa, no se observó ninguna banda que pudiera corresponder con la proteína correspondiente en cada caso, si bien la inducción del control de secreción en las mismas condiciones (GS115/Albúmina) permitió detectar la proteína de 119 KDa en el medio (Figuras 4.36 A; 4.37 y 4.38). Tampoco se detectó ninguna banda mediante análisis por WB con el anticuerpo anti-myc, observándose señal sólo para el control (GS115/pPICZ/LacZ) inducido en las mismas condiciones.

Se ha descrito en la literatura, que para una proteína que normalmente no se secreta, puede resultar difícil e incluso imposible provocar su secreción cuando se expresa en *P. pastoris* (Sreekrishna *et al.*, 1997). De hecho, existen numerosos trabajos en los que a pesar de fusionar la proteína de interés a una señal de secreción, finalmente se ha acumulado en el interior celular (Farnós *et al.*, 2005; Sugrue *et al.*, 1997; Swiatek *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2007).

- Dado el carácter insoluble que esta proteína presentó cuando se expresaba en *E. coli*, se decidió analizar los restos celulares recogidos tras la lisis, con objeto de detectar una posible agregación de la proteína L1 de VPH18 con las membranas de *P. pastoris*, teniendo en cuenta además, que esta levadura presenta un tráfico intenso de proteínas a través de distintos compartimentos intracelulares, que implica la asociación de diversas proteínas a las membranas de los mismos (Chang *et al.*, 2005; Payne *et al.*, 2000; Rieder *et al.*, 1996). Se desarrollaron diversos protocolos de lisis (con perlas de vidrio, lisis enzimática con zimoliasa y glucanex y generación de esferoplastos con liticasa), para

asegurar la ruptura de la pared celular, y distintos tratamientos de las fracciones insolubles con tampones conteniendo detergentes y agentes reductores, que han sido utilizados en la literatura referida a expresión de proteínas virales en *P. pastoris* (Acosta-Rivero *et al.*, 2004, Martínez-Donato *et al.*, 2006). Tras los análisis en SDS-PAGE y WB, no se obtuvo ninguna banda que pudiera corresponder con las proteínas de interés en cada caso, ni aún cuando se concentraron las proteínas contenidas en cada fracción.

- Ante la posibilidad de que no se estuviesen dando condiciones óptimas para la expresión, nos planteamos inducir en fermentador la construcción correspondiente a la región L1 delecionada en el extremo N-terminal. Como ya hemos comentado anteriormente, los niveles de proteína heteróloga expresada en cultivos de *P. pastoris* en fermentador pueden ser de 3 a 5 veces superiores a los que ocurren en cultivos que crecen en exceso de metanol (como puede ocurrir en erlenmeyer). Así, incluso para proteínas expresadas intracelularmente, los rendimientos son superiores en estos cultivos. Además, el metabolismo del metanol supone el consumo de grandes cantidades de oxígeno, con lo que la expresión de genes foráneos se puede ver afectada por la limitación de éste en el medio. Sólo en el ambiente completamente controlado del fermentador, se puede ajustar el nivel de oxígeno en el medio de cultivo (Cereghino & Cregg, 2000).

Por tanto, se seleccionó un clon que presentaba resistencia a elevadas concentraciones de zeocina, y se sometió a crecimiento en fermentador. Se empleó un protocolo ya descrito (Cunha *et al.*, 2004), optimizado para la producción de un anticuerpo en una cepa de *P. pastoris* Mut⁺. Como era de esperar, al final del proceso de fermentación se alcanzó una densidad celular muy elevada (de 335 g/L). Las células inducidas fueron analizadas para detectar la presencia de la proteína heteróloga mediante SDS-PAGE y WB con el anticuerpo HPV-4C4. Se analizaron los lisados completos, las fracciones insolubles solubilizadas, y las fracciones concentradas sin detectarse la proteína de 56 KDa.

- Ante la posibilidad de que el problema de expresión tuviese lugar a nivel de transcripción, se planteó el análisis de los niveles de transcripción por RT-PCR empleando cebadores específicos de L1. Como control se llevó a cabo amplificación del ADNc del gen que codifica el factor de la elongación 1 α de *P. pastoris*, cuyo promotor está descrito como promotor constitutivo (Ahn *et al.*, 2007). Los niveles de expresión fueron los mismos antes y después de la inducción con metanol en todas las

construcciones. Por tanto, parece que existe expresión del gen foráneo, aunque se trataría de una expresión basal. Dicha expresión podría comenzar cuando se produce el agotamiento de glicerol en el medio, al final de la fase de crecimiento.

La integración por recombinación homóloga en otro lugar del genoma, distinto del entorno de la alcohol oxidasa, podría ser una de las causas de la ausencia de inducción de la expresión. La amplificación con los cebadores comerciales AOX5'/AOX3' proporcionados en el kit, sólo nos permite conocer si el casete de expresión se ha integrado en el genoma de la levadura, pero no dónde. En resumen, los niveles basales de expresión podrían ser debidos a problemas de inducción o bien a la existencia de mensajeros inestables de corta vida media, o incluso a mensajeros truncados como consecuencia de la existencia de señales tempranas de terminación de la transcripción.

- Con respecto al primer punto (problemas de inducción) es posible que las condiciones de inducción no hayan sido las más adecuadas, puesto que los ensayos se realizaron en erlenmeyer donde, como hemos mencionado anteriormente, no es posible el control estricto de parámetros. Sin embargo, con las muestras obtenidas del fermentador, también se realizó una RT-PCR y posterior amplificación de ADNc a las 24 y 48 horas de inducción y tampoco en este caso se observaron diferencias apreciables en la intensidad de la banda (Tabla 4.5 B). Una vez más estaríamos ante unos niveles de transcripción basales, mantenidos durante todo el periodo correspondiente al crecimiento en presencia de metanol como fuente de carbono.

- Con respecto a la estabilidad de los transcritos, se han propuesto varias características de los genes clonados que pueden afectar a los niveles de expresión en *P. pastoris* especialmente la presencia de regiones ricas en A+T (Boettner *et al.*, 2007). Los genes con alto contenido en A+T, no se transcriben bien, debido a una finalización de la transcripción prematura (Gurkan & Ellar, 2003; Sreekrishna *et al.*, 1997). Dado que existen muchas secuencias ricas en A+T que aún no se han identificado como terminadoras de la transcripción en *Pichia*, una estrategia general radicaría en rediseñar los genes de forma que tengan un contenido en A+T situado entre el 30 y el 55%.

El contenido en A+T de la secuencia para el gen que nos ocupa en estas construcciones es cercano al 59%. Además contiene numerosos grupos ricos en A+T, que podrían promover una terminación temprana de la transcripción. Por ejemplo, la secuencia ATTATTTTAT ha sido descrita como responsable de la terminación prematura de la transcripción del gen que codifica la proteína gp120 del VIH-1 cuando

se expresaba en *P. pastoris*. Cuando se modificó esta secuencia, se encontraron transcritos más largos (Scorer *et al.*, 1993). En el caso que nos ocupa encontramos en posición 546 una secuencia TTTTATA, descrita como promotora de terminación temprana de la transcripción en *S. cerevisiae* (Henikoff & Cohen, 1984), y frecuentes grupos ricos en A+T. En el estudio realizado en este trabajo mediante RT-PCR, se ha amplificado un fragmento de tan sólo 120 pb, localizado en la posición 600 del gen *l1* en el alineamiento (ver anexo 1), por lo que podríamos estar pasando por alto un fenómeno de interrupción temprana de la transcripción. No obstante, en un clon para la construcción $\Delta N6118VLPZ$, se realizó también el análisis del ARNm empleando la pareja de cebadores 18L1F700/18L1FRn que amplificaron un fragmento de tamaño superior (400 pb) localizado en la posición 1270 del gen *l1* (datos no mostrados) que indicaría la presencia de mensajeros más largos. Pero también se ha descrito la existencia de una población heterogénea en tamaño de ARNm para la L1 de VPH11 expresada en *S. cerevisiae*, debidas a generación de mensajeros interrumpidos, que desaparecía cuando se modificaba la secuencia para disminuir el contenido en A+T (Neeper *et al.*, 1996). Además, parece que las secuencias que llevan a la terminación de la transcripción en levaduras están constituidas por varios elementos, ya que aunque la secuencia descrita (TTTTTAT) es capaz de promover la terminación de la transcripción por sí sola, existen otros elementos situados corriente abajo que podrían también intervenir en dicha terminación, ya que cuando éstos son delecionados, se observa la aparición de una población heterogénea de ARNs mensajeros con distintas longitudes (Henikoff & Coehn, 1984).

Existe un único trabajo publicado por Li y colaboradores (Li *et al.*, 2003; publicación en chino con resumen en inglés) donde se describe la expresión de la proteína L1 de VPH6 en *P. pastoris*. En este trabajo se realiza la modificación de los codones y la eliminación de regiones ricas en A+T a pesar de que el contenido A/T de este tipo de VPH es ligeramente menor que el del tipo 18. Aún así, solo se consiguió un rendimiento de 125 µg de proteína por litro de cultivo inducido. La expresión se realizó en la cepa KM71, empleando el vector pPIC3.5K, seleccionándose clones multicopia por análisis de resistencia a neomicina. Tras la inducción en medio tamponado BMMY, obtuvieron tres clones que expresaban la proteína L1 de VPH6, que fue reconocida por un anticuerpo frente a epítopos conformacionales de L1 de VPH6, por lo que se dedujo que la proteína conservaba dichos epítopos nativos.

Sin embargo, con esta transcripción basal y con técnicas sensibles como el análisis por WB, tal vez se deberían haber detectado niveles mínimos de expresión de la proteína. Por tanto quizá podrían existir otros problemas relacionados con la traducción del gen insertado. En la literatura se han descrito otros factores relacionados con los niveles de expresión de proteínas heterólogas en esta levadura (Boettner *et al.*, 2007). Así puntos isoeléctricos (pI) altos se asocian con expresión proteica no detectable. Las construcciones generadas presentan puntos isoeléctricos de 7,7 (construcción 18L1Zα), 8,1 (construcción 18VLPZ) y 7,8 (construcción ΔN6118VLPZ). Se trata por tanto de proteínas con puntos isoeléctricos elevados, que podrían expresarse mal. También podríamos estar ante un problema de diferencias en las frecuencias de utilización de codones en ambos organismos (*P. pastoris* y VPH), a pesar de que éstas no son muy distintas (Anexo 2).

- Por tanto, se precisan más experimentos para dilucidar los problemas de expresión de este antígeno en *Pichia pastoris*. Probablemente una primera aproximación podría corresponder a la expresión de la construcción a partir del tercer ATG (ATG consenso), modificando algunos de los tripletes de la secuencia L1, no tanto para su ajuste a los codones más utilizados en levaduras (que como ya hemos mencionado tienen elevada similitud) sino en la modificación de los tripletes localizados en las regiones ricas en A/T.

Esta adaptación del contenido en A+T podría acompañarse de modificaciones en el entorno del ATG de inicio (secuencia de Kozak). De hecho, cuando la proteína L1 de distintos tipos de VPH se ha expresado en *S. cerevisiae* (Cook *et al.*, 1999; Joyce *et al.*, 1999; Mach *et al.*, 2006; Neeper *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2005), se han incorporado las modificaciones descritas por Hofmann y colaboradores (Hofmann *et al.*, 1995) relacionadas con la adición de secuencias *leader* de levaduras, inmediatamente antes del ATG de inicio. Estas modificaciones se basaron a su vez en las descritas en el trabajo sobre VHB de Kniskern y colaboradores (Kniskern *et al.*, 1986), en el que el gen a expresar, se fusionó al promotor GAP491 de *S. cerevisiae*, con todas las secuencias no traducidas de la levadura flanqueando la secuencia del gen heterólogo. Dichas modificaciones permitieron incrementar la producción del antígeno del “core” del VHB en *Saccharomyces*, alcanzando niveles de hasta el 40% del total de proteínas solubles.

5.4. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA L1 DE VPH18 EN CÉLULAS DE INSECTO

El sistema de baculovirus, ha sido ampliamente estudiado para la producción de VLPs, especialmente en los casos donde el cultivo de los virus no es posible o presenta grandes dificultades, como en el caso de los Papilomavirus o el virus de la hepatitis C (Kost *et al.*, 2005). Muchos son los trabajos en los que se han producido VLPs de VPH en células de insecto (Tabla 1.3). Sin embargo la mayoría de ellos están dedicados a la producción de VLPs, siguiendo protocolos ya descritos, para realizar posteriores ensayos serológicos, y no al estudio y optimización de los parámetros que afectan a la expresión de la proteína en el sistema basado en baculovirus recombinantes. Además, la mayoría de los trabajos están basados en VPH16, y sólo uno de ellos está centrado en la optimización de la producción y purificación de VLPs de este mismo tipo (Zheng *et al.*, 2004).

Por ello, el planteamiento fue realizar un estudio de la cinética de expresión de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto empleando baculovirus recombinantes, con objeto de determinar, igual que para bacterias, cuáles eran las condiciones óptimas para la obtención de máximos niveles de expresión de la proteína, que posteriormente puedan ser aplicadas para la producción a mayor escala. La obtención de los máximos niveles de proteína parece crucial puesto que, un aumento en la concentración local de monómeros proteicos puede ser importante para un plegamiento adecuado en el caso de proteínas virales (Benicasa *et al.*, 1996). Además se sabe que en general menos del 15% de las proteínas virales expresadas en este sistema son capaces de ensamblar en VLPs (Vieira *et al.*, 2005).

5.4.1 Diseño de la construcción

Para la expresión de la proteína L1 de VPH18 en baculovirus, se ha empleado un sistema basado en la cotransfección de un ADN viral linealizado y un vector de transferencia conteniendo el gen de interés (Kitts & Possee, 1993), según se describe en el apartado 3.2.12.

La región L1 de VPH18, en este caso se amplificó a partir del tercer ATG del ORF para L1 proporcionado por las bases de datos (localizado en la base 5613 del genoma completo). La traducción a partir del tercer ATG (segundo en el VPH16) da lugar a proteínas que se ensamblan en cápsidas virales. Este ATG es común a los tipos

de VPH de alto y bajo riesgo. Pero sólo en virus asociados con el desarrollo de cáncer, existe otro ATG alternativo corriente arriba (u otros dos en VPH18) que darían lugar a una proteína que no se ensambla en cápsidas, por lo que en esos casos, el exceso de ADN no encapsidado podría integrarse en el genoma de la célula hospedadora (Webb *et al.*, 2005), fenómeno relacionado con mayor riesgo de progresión hacia HSIL. Además, algunos autores ya habían apuntado previamente que cuando expresaban en células de insecto las proteínas L1 y L2, o la proteína L1 sólo a partir del primer ATG del ORF, si bien se observaban complejos proteicos L1/L2, o agregados de L1, no detectaban VLPs. Sin embargo, otros grupos sí lo hacían cuando usaban el triplete ATG localizado corriente abajo (Cason *et al.*, 1994; Kirnbauer *et al.*, 1992; Xi & Banks 1991; Zhou *et al.*, 1991).

5.4.2 Optimización de la producción de VLPs

Muchos son los parámetros que pueden afectar a la producción de una proteína determinada en el sistema de baculovirus recombinantes, entre ellos, la composición del medio de cultivo, la línea celular empleada, el índice de multiplicidad de la infección, el tiempo de infección, etc. La influencia de estos parámetros sobre la producción de la proteína L1 de VPH18 se determinó mediante infecciones realizadas en erlenmeyer. Puesto que también se trató de optimizar la producción con el menor coste posible, se empleó el medio SF900II, en lugar del medio de Grace, ya que el primero es más barato y además contiene aminoácidos con lo que no es necesario suplementarlo con L-glutamina. También se trató de evitar el uso de antibióticos, que encarecen la producción, trabajando en rigurosas condiciones de esterilidad.

- En los primeros ensayos se pretendió determinar cuál de las líneas celulares derivadas de *Spodoptera frugiperda* (Sf9 y Sf21) expresaba la proteína en mayores niveles. Davis y colaboradores (Davis *et al.*, 1993), demostraron que estas líneas celulares tienen distinta capacidad para expresar diferentes proteínas heterólogas. Por ello era necesario comprobar experimentalmente cuál era la mejor para la expresión de cada proteína recombinante en particular. Las líneas Sf9 y Sf21 son muy similares en sus características: (1) células fácilmente cultivables en monocapa y en suspensión, (2) altamente susceptibles a la infección con el virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), (3) capaces de crecer rápidamente hasta alcanzar

altas densidades y producir virus no oclusivos en elevados títulos, (4) fácilmente adaptables a crecer en medio sin suero y al escalado (Granados *et al.*, 2007).

Al mismo tiempo se evaluó cuál era el efecto de la presencia de SFB en el medio sobre la expresión de la proteína. Tradicionalmente, el uso de suero para promover la infección con baculovirus recombinantes, se basó en las observaciones empíricas realizadas por distintos laboratorios que empleaban este sistema. Actualmente se considera que la afinidad de los baculovirus por los receptores celulares se incrementa cuando el medio es suplementado con SFB (Maranga *et al.*, 2002), aunque en los trabajos originales consideraban que algunos componentes del suero podían afectar a su capacidad de unión (Power *et al.*, 1996).

Las infecciones se realizaron siempre en cultivos en fase exponencial de crecimiento. Se ha demostrado que cuando las células se infectan en esta fase, el índice de producción de virus, y consecuentemente, de proteína recombinante es mayor (Kioukia *et al.*, 1995, Philipps *et al.*, 2005). Durante la fase S, la síntesis de ADN viral incrementada puede ayudar al virus a replicar su genoma a mayor velocidad, debido a la mayor disponibilidad de precursores y enzimas implicados en la replicación. Esto se traduce en mayores niveles de ARNm para la proteína heteróloga y por tanto en mayores niveles de proteína.

Tras el análisis por WB con el anticuerpo monoclonal HPV-4C4, y la cuantificación de las bandas, los máximos niveles de expresión fueron detectados en la línea Sf21 tras 48 horas de infección, tanto en presencia como en ausencia de SFB en el medio. Así, empíricamente demostramos que la línea celular Sf21 es capaz de producir la proteína Δ N6118VLP en niveles superiores a la línea Sf9 (Figura 4.45).

Cabe destacar que en ausencia de SFB, aparecía una segunda y hasta una tercera banda que reaccionaba con el anticuerpo monoclonal en WB (Figura 4.44). Se ha descrito en la literatura la aparición de una forma delecionada de la proteína L1 de VPH11 en su extremo C-terminal (45 KDa), que reaccionaba con los anticuerpos anti-L1 (Cook *et al.*, 1999). Así, en nuestro caso podría estar ocurriendo una degradación de la proteína Δ N6118VLP. Estas supuestas bandas de degradación son más intensas, y aparecen antes cuando la infección tiene lugar en medio sin SFB. La lisis de las células lleva a la liberación al medio de la proteína recombinante, acumulada fundamentalmente en el núcleo y también en el citoplasma (Rose *et al.*, 1993). Parece que determinados componentes del SFB protegen a las células del estrés general producido por las fuerzas de rozamiento y las burbujas que se generan en los cultivos en

suspensión, y por compuestos tóxicos (Schlaeger, 1996). Por tanto, la ausencia de SFB en el medio podría llevar a una lisis temprana de las células infectadas con la consecuente liberación y degradación de la proteína recombinante. De hecho, las mayores viabilidades celulares en todos los casos se registran en presencia de SFB (Figura 4.45, B).

De esta primera aproximación concluimos que los mayores niveles de expresión de la proteína de interés, empleando un MOI de 5 ufp/célula, seleccionado aleatoriamente, tenían lugar en la línea Sf21. Además el SFB podría estar ejerciendo un efecto protector sobre las células, favoreciendo de forma indirecta la estabilidad de la proteína de interés.

- En los siguientes ensayos se trató de determinar cuál era el MOI y el tiempo de infección en el que se obtenían los mayores niveles de proteína $\Delta N6118VLP$, cuando se infectaban células Sf21 en medio suplementado con SFB al 10%. Se eligieron cuatro MOI utilizados habitualmente (0,1; 1; 5 y 10 ufp/célula) En éste caso, se determinó que los mayores niveles de expresión de la proteína se obtenían con MOI de 5 ufp/célula (Figura 4.48) tras una infección durante 48 horas, seguidos de MOI 10 ufp/célula durante 48 horas, MOI 0,1 ufp/célula durante 72 horas y finalmente MOI 1 durante 72 horas (sin excesivas diferencias entre estos dos últimos).
- Establecidas las condiciones en las que se obtenían los mayores niveles de expresión de la proteína $\Delta N6118VLP$, el siguiente paso fue la purificación de VLPs, comparando los resultados obtenidos para cada uno de los cuatro MOI y para cada uno de los tiempos en los que se observaba la máxima producción de proteína en los ensayos de cinética.

Para realizar la lisis de las células, se empleó el choque osmótico, aunque se puede realizar por diversos mecanismos. La ruptura mediante dicho método provoca lisis y daño osmótico a las membranas nucleares y de otros orgánulos, por lo que resulta de interés cuando la proteína se acumula en éstos (Bernard *et al.*, 1996). El tampón utilizado (Tabla 3.13), se suplementó además con el detergente Tritón X-100, que ha sido descrito como un agente que garantiza la inactivación de los baculovirus contaminantes que pueden estar presentes en las células infectadas (Peixoto *et al.*, 2007). Para asegurar la liberación completa del material nuclear, se acompañó esta lisis de otra posterior mediante sonicación. Este protocolo ya ha sido empleado Baylis *et al.* (1991) para la liberación de la DNasa alcalina del virus del Epstein-Barr expresado en células Sf9.

Los siguientes pasos de centrifugación y clarificación con sacarosa nos permitieron recuperar fundamentalmente la fracción nuclear. Finalmente se empleó la purificación en gradiente de cloruro de cesio, utilizada habitualmente para la purificación de las VLPs.

Recuperadas las bandas del cloruro de cesio, el siguiente paso fue eliminar la sal (que es tóxica) mediante intercambio con el tampón PBS suplementado con diversas sales, especialmente NaCl, que se supone que aportan la fuerza iónica necesaria para que tengan lugar interacciones entre proteínas, favoreciendo el ensamblaje y la estabilidad de las partículas formadas (McCarthy *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2005). Este método, realizado en columnas de desalado, fue preferido frente a la diálisis, por ser más rápido y porque además permite la separación de sustancias de alto y bajo peso molecular. Además los largos tiempos empleados en la diálisis pueden favorecer la degradación de las proteínas. No obstante, sería preciso desarrollar también otros métodos de purificación que eviten el uso de CsCl, que es tóxico, y que sean más reproducibles y que permitan eliminar contaminantes (baculovirus, VLPs incompletas, agregados...). Peixoto y colaboradores (Peixoto *et al.*, 2007) describen un protocolo de purificación de VLPs de rotavirus, en el que se combina un primer paso de diafiltración y ultrafiltración para eliminación de los contaminantes de bajo peso molecular y del tritón empleado en la lisis, combinado con una cromatografía de exclusión por tamaño, obteniéndose al final del proceso rota-VLPs con una pureza final del 95%. La cromatografía de exclusión por tamaño ya ha sido empleada en algunos trabajos para la purificación de VLPs de VPH producidas en *S. cerevisiae* (Cook *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2007).

El análisis cuantitativo y cualitativo de las muestras obtenidas de las distintas infecciones confirmó que los niveles de proteína (medidos como concentración de proteína total empleando el método BCA) obtenidos tras la purificación en las células Sf21, fueron mayores que los obtenidos en las células Sf9. Se confirmaron así los resultados obtenidos en los ensayos de cinética, en los que se observó que los mayores niveles de proteína L1 se obtenían cuando ésta se expresaba en células Sf21.

El análisis cualitativo de las muestras de VLPs, se llevó a cabo empleando dos técnicas: la microscopia electrónica y dispersión dinámica de luz (DLS). La utilidad de la combinación de ambas ha sido reflejada con anterioridad para estudiar el ensamblaje de las VLPs de VPH16 producidas en *E. coli* (Hanslip *et al.*, 2006).

Mediante estas dos técnicas, podríamos concluir, que la mayor cantidad y calidad de VLPs de VPH tipo 18, se obtienen cuando las células Sf21 se infectan con MOI de 10 ufp/célula, a las 48 horas de infección (Tabla 4.7). Mediante microscopía electrónica se pudieron observar VLPs completas en la muestra correspondiente a la primera fracción recogida durante el desalado, que se corresponderían con partículas de 55 nm (VLPs, con simetría T=7) y 100 nm (agregados de pentámeros); y en la muestra correspondiente a la segunda fracción, partículas de aproximadamente 40 nm (posiblemente VLPs de simetría T=1) y de 12 nm (que se corresponderían con las estructuras de “donut” típicas de capsómeros). Esta divergencia de partículas observadas en ambas muestras podría explicar además el comportamiento durante el desalado de la muestra original recogida del gradiente de cloruro de cesio, ya que la elución se produjo en dos picos (Figura 4.50). Las columnas presentan una matriz de perlas de dextrano, y aunque originalmente está diseñada para separar partículas de bajo peso molecular, es lógico que partículas de tamaños mayores eluyan antes (VLPs) que otras de menor tamaño y peso molecular (capsómeros), ya que las primeras no podrían penetrar en el entramado generado por la matriz, en tanto que las de menor tamaño podrían sufrir algún tipo de retención eluyendo justo después.

Si analizamos los resultados obtenidos con los distintos MOIs, sólo en el caso de la infección con MOI 0,1 ufp/célula, no se detectó ni proteína en análisis por WB, ni partículas en microscopía electrónica. Además por DLS se obtuvo un pico para partículas de tamaño de 20 nm (compatible con capsómeros) que no fueron observados por tinción con acetato de uranilo (Tabla 4.7). La concentración de proteína total obtenida en la banda recuperada del gradiente, en este caso es muy baja, aunque próxima a la detectada en la infección en células Sf9, en las que si se detectaron VLPs.

Al analizar el resto de infecciones, los datos obtenidos por DLS y microscopía, no son coincidentes en todas las muestras. De hecho, en los casos en los que la dilución de la muestra para DLS lleva a concentraciones de proteína de 30 µg/ml (MOI 5 en ambas líneas celulares), la técnica no identifica VLP, sino partículas de tamaño inferior, mientras en dichas muestras pudieron observarse claramente VLPs por microscopía. La técnica DLS es muy sensible, de forma que la presencia de pequeñas cantidades de polvo o agregados proteicos susceptibles de producir un exceso de dispersión, lleva a la reducción de la resolución. Por ello es necesario filtrar y diluir las muestras. Se sabe que en este caso la concentración de proteína L1 empleada se encuentra en el límite inferior de concentración (20-200 µg/ml) necesaria para el ensamblaje en VLPs establecido por

Casini y colaboradores (Casini *et al.*, 2004). Así puede ser que al diluir las muestras se haya promovido el desensamblaje de las partículas, de forma que hubiera sido recomendable incubar las diluciones durante un tiempo prudencial que permitiera el reensamblaje, antes de llevar a cabo las medidas por DLS. La combinación de las técnicas basadas en la dispersión de luz, junto con la microscopia electrónica podría facilitar la determinación de la calidad de las muestras de VLPs obtenidas tras distintos métodos de purificación.

- Como ya hemos comentado, de estos ensayos podemos concluir que las partículas de mejor calidad se obtienen cuando las células Sf21 se infectan con un MOI de 10 ufp/célula, llevándose a cabo la recolección de las células para la posterior purificación de VLPs 48 horas después de la infección. Parece que los tiempos de infección cortos son óptimos para la recuperación de proteínas, en términos de rendimiento, estabilidad y disminución del riesgo de aparición de proteínas contaminantes. Pero en los estudios de cinética, los mayores niveles de expresión de la proteína L1 de VPH18 se encontraron en cambio cuando la infección se realizaba con MOI 5. Hay que tener en cuenta que estos ensayos se realizaron en erlenmeyer, en tanto que los ensayos de purificación de VLPs fueron llevados a cabo en fermentadores de volumen de trabajo de 250 ml, con lo que se están introduciendo modificaciones, fundamentalmente en lo referido a aireación, que pueden ser críticas y podrían explicar estas diferencias de resultados.

- Con las VLPs producidas en este sistema en las células Sf9, se realizó un ensayo de ELISA. En él se pretendía comparar la respuesta de un pequeño panel de sueros humanos, frente a la proteína recombinante GST- Δ N7118L1 eluida en PBS y en PBS/urea, frente a las VLPs, por ser consideradas éstas el estándar de oro en las aproximaciones en serología de VPH. En este caso, aunque los sueros humanos se comportaron de la misma forma que cuando eran enfrentados a la proteína recombinante, el valor de corte obtenido fue muy bajo (0,35). Karem y colaboradores (Karem *et al.*, 2002), establecieron un protocolo de ELISA reproducible y con una sensibilidad de un 93% y un 98,5% de especificidad. En el ensayo, para la sensibilización de las placas emplearon VLPs de VPH16 resuspendidas en PBS (en lugar de tampón carbonato/bicarbonato), ya que la reactividad observada en este último era menor que la observada en PBS, permitiendo una peor discriminación entre sueros positivos y negativos. Se planteó que esta diferencia pudiera ser debida al carácter desnaturalizante del tampón carbonato/bicarbonato, que podría provocar un

desensamblaje parcial de las VLPs por el pH básico (Wang *et al.*, 2005). El punto de corte que obtienen en este trabajo para discriminar entre sueros positivos y negativos, es de 0,6. En el trabajo descrito en esta tesis, la utilización de este tampón básico podría ser otra causa de la disminución de la reactividad de los sueros humanos en comparación con la observada en el caso de la proteína producida en *E. coli*.

Además, los ensayos se han realizado con VLPs almacenadas durante un largo periodo de tiempo a 4°C, con lo que puede estar teniendo lugar desintegración parcial de las partículas. Estos fenómenos de desintegración parcial de VLPs almacenadas a 4°C en tampones similares (DPBS) ya han sido recogidos en la literatura en VLPs de rotavirus, constituidas por tres proteínas, siendo una de ellas una glicoproteína (Peixoto *et al.*, 2007). Estos fenómenos parecían evitarse mediante la adición de crioprotectores (sacarosa, glicerol y trehalosa) que permitían conservar intactas el 75% de las VLPs después de 4 meses.

Se ha evaluado por tanto la expresión de la proteína L1 de VPH18 en tres sistemas diferentes. Si bien son muchos los estudios referidos a la expresión de la proteína L1 del VPH tipo 16, apenas existen trabajos en los que se aborde específicamente la expresión de la proteína L1 del tipo 18, que habitualmente conlleva una producción más costosa. El primer reto ha sido la producción eficaz de la proteína como proteína recombinante en bacterias, puesto que se trata de un sistema rápido y barato, para la obtención de antígenos de aplicación en sistemas serológicos. Dado que en *E. coli* existe un problema de acumulación de la proteína en forma de cuerpos de inclusión difíciles de solubilizar y una contaminación con chaperonas bacterianas, se planteó la posibilidad de expresar la proteína y producir también VLPs en el sistema de *P. pastoris*. Se trata de un sistema alternativo al basado en la levadura *S. cerevisiae*, ya que presenta ventajas frente a esta última: entre ellas su capacidad para crecer a densidades ópticas elevadas, la utilización de metanol como fuente de carbono que es un agente inductor barato y la ausencia de fenómenos de hiperglicosilación. Sin embargo, parece que la expresión en esta levadura metilotrófica podría requerir la optimización de la secuencia que codifica para L1 de VPH18, en lo referido a modificación de secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción. La posible expresión de la proteína, tras la introducción de dichas modificaciones, podría suponer un avance en la producción de VLPs para el desarrollo de sistemas serológicos. Finalmente, dado que

hoy en día el sistema basado en baculovirus recombinantes (aún a pesar de ser el más complejo, costoso en tiempo, y el menos económico) es el más empleado para la producción de dichas partículas, los estudios de cinética y optimización de la expresión resultan de gran interés para facilitar la producción en este sistema.

La producción de antígenos de VPH con utilidad clínica sigue siendo necesaria, especialmente para el estudio de la respuesta inmune frente a la infección natural, dada la diversidad encontrada en dicha respuesta que podría estar relacionada con la progresión de la enfermedad. Por otro lado, la introducción de las vacunas frente a la infección con VPH plantea nuevos retos para la serología, relacionados con el establecimiento de nuevas pruebas específicas y sensibles para valorar la respuesta inmune humoral en la población vacunada, más aún cuando en la actualidad se desconoce la perdurabilidad de la protección conferida por la vacunación.

Los estudios serológicos de la detección de la infección por papilomavirus, exigen fundamentalmente el incremento de la sensibilidad. En este sentido, cada vez se acepta más la idea de una serología multiplex, en la que los sueros son enfrentados a varios antígenos (Dillner *et al.*, 2006, Waterboer *et al.*, 2005). Además, como ya se ha indicado, si bien el 60% de las mujeres infectadas con VPH16 y 18 seroconvierten, en muchas ocasiones los niveles de anticuerpos producidos tras la infección natural son muy bajos y podrían situarse por debajo del límite inferior detectable en el ensayo serológico empleado (Villa *et al.*, 2005). Otras observaciones que apoyan la serología multiplex surgen de la expresión diferencial de proteínas de VPH que tiene lugar en función de la evolución de la infección. Cuando tiene lugar una infección productiva, en las últimas capas del epitelio escamoso estratificado se produce la expresión de las proteínas L1 y L2 y por tanto el ensamblaje y liberación de nuevos viriones. En el caso de progresión de la infección hacia HSIL, apenas existe expresión de dichas proteínas, y sin embargo, hay una elevada traducción de proteínas E6 y especialmente E7 a lo largo de todos los estratos del epitelio.

Por tanto, y fundamentalmente para el estudio de la respuesta inmune frente a la infección natural, la serología multiplex parece la opción más admitida. En ésta podría tener más cabida la producción de antígenos de VPH en sistemas sencillos y baratos como los basados en la bacteria *E. coli*, por lo que la optimización de la producción de estos antígenos puede ser de gran interés.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La expresión de las proteínas de fusión GST-ΔN7118L1 (que contiene la proteína L1 de VPH18 carente de 10 aminoácidos desde la metionina consenso) y GST-18L1Ct (que contiene sólo el extremo carboxi-terminal de la misma proteína) en *E. coli*, lleva a la acumulación de éstas en forma de cuerpos de inclusión. El uso de agentes reductores y lisozima durante la lisis, así como de detergentes y agentes reductores para la solubilización de la fracción insoluble permitió incrementar la recuperación de ambas proteínas. En futuras aproximaciones, la utilización de cepas de *E. coli* super-productoras, como las cepas C41(DE3) y C43(DE3), podría resultar un paso importante para incrementar el rendimiento final de la producción.
2. La purificación de la proteína heteróloga GST-ΔN7118L1 mediante cromatografía de afinidad con glutation y una etapa posterior de purificación en PBS/urea, ha permitido eliminar proteínas de la bacteria que coprecipitaban con la proteína de fusión (posibles chaperonas bacterianas) que se muestran altamente inmunoreactivas.
3. La proteína de fusión GST-ΔN7118L1 parece contener epítomos lineales y/o conformacionales que son reconocidos en *Western blot* y en ELISA por anticuerpos comerciales y por sueros humanos procedentes de infección natural. En cambio, la proteína de fusión GST-18L1Ct sólo es reconocida por anticuerpos anti-GST.
4. La expresión de proteínas de L1 de VPH18 en *P. pastoris* no pudo ser llevada a cabo con éxito a pesar de todas las aproximaciones abordadas. El análisis de los ARNs mensajeros permitió comprobar la existencia de transcripción del ADN que codificaba las proteínas de interés en cada caso, sin embargo siempre a unos niveles basales no inducibles por metanol. Se plantea la modificación de la secuencia, mediante mutagénesis dirigida, para incrementar el contenido en G+C, y eliminar los grupos ricos en A/T en futuros trabajos.
5. Los ensayos de cinética de expresión de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto mediante la utilización de baculovirus recombinantes, revelaron que la

proteína es expresada en mayores niveles en células Sf21, cuando son infectadas con un MOI de 5 ufp/célula durante 48 horas, en un medio suplementado con suero fetal bovino que parece prevenir la degradación proteolítica de la proteína. En los ensayos realizados en fermentadores de pequeños volúmenes, para la purificación de partículas similares al virus (VLPs), los mejores resultados en cuanto a cantidad y calidad se obtuvieron cuando se realizaban infecciones con un MOI de 10 durante 48 horas.

6. Se han realizado por primera vez ensayos de cinética de expresión de la proteína L1 de VPH18 en células de insecto, mediante la utilización de baculovirus recombinantes. Estos estudios permiten el establecimiento de modelos para la producción optimizada de dichas partículas.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- . Acosta-Rivero N., Rodríguez A., Musacchio A., Falcón V., Suarez V.M., Martinez G., Guerra I., Paz-Lago D., Morera Y., de la Rosa M.C., Morales-Grillo J., Dueñas-Carrera S. (2004). In-vitro assembly into virus-like particles is an intrinsic quality of *Pichia pastoris* derived HCV core protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**:68-74.
- . Ahn J., Hong J., Lee H., Park M., Lee E., Kim C., Choi E., Jung J., Lee H. (2007). Translation elongation factor 1- α gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**:601-608.
- . Araujo K., Marqués A., Mendes S., Lina L., Boccardo E., Pérez-Martínez G., Pérez-Arellano I., Sarno M.L., Lee P. (2006). Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**:745-52.
- . Arias-Pulido H., Peyton C.L., Torrez-Martínez N., Anderson N.D., Wheeler C.M. (2005). Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2 and L1 regions. *Virology*, **338**:22-34.
- . Baker T.A., Grossman A.D., Gross C.A. (1984). A gene regulating the heat shock response in *Escherichia coli* also affects proteolysis. *PNAS*, **81**:6779-83.
- . Baker T.S., Newcomb W.W., Olson N.H., Cowser L.M., Carl Olson C., Brown J.C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.*, **60**: 1445-1456.
- . Baseman J.G., Koutsky L.A. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *J. Clin. Virol.*, **32** Suppl 1:S16-24.
- . Bates M.K., Zhang G., Sebastián M.G., Neal Z.C., Wolff J.A., Herweijer H. (2006). Genetic immunization for antibody generation in research animals by intravenous delivery of plasmid DNA. *Biotechniques*, **40**:199-208.
- . Baylis S.A., Purifoy D.J.M., Littler E. (1991) High level expression of the Epstein Barr virus alkaline deoxyribonuclease using a recombinant baculovirus: application to the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Virology*, **181**:390-394.
- . Benicasa D., Silberklang M., Mark G.E., Ludmerer S.W. (1996). Rapid, High-level transient expression of papillomavirus-like particles in insect cells. *Biotechniques*, **20**:890-895
- . Benion B.J., Daggett V. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *PNAS*, **100**:5142-5147.
- . Bernard A.R., Lusti-Narasimhan M., Radford K.M., Hale R.S., Seville E., Graber P. (1996). Downstream processing of insect cell cultures. *Cytotechnology*, **20**:239-257.
- . Bernard H.U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.*, **32S**:S1-S6.
- . Bernard H.U., Chan S.Y., Manos M.M., Ong C.K., Villa L.L., Delius H., Peyton C.L., Bauer H.M., Wheeler C.M. (1994). Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by Polymerase Chain Reaction amplification, Restriction Fragment Length

Polymorphisms, Nucleotide Sequence, and Phylogenetic Algorithms. J. Infect. Dis., **170**:1077-1085.

. **Birnboim H.C., Doly J.** (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res., **7**:1513-1522.

. **Bishop B., Dasgupta J., Chen S.** (2007). Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. Virol. J., **4**:3.

. **Bodily, J.M., Meyers, C.** (2005). Genetic analysis of the human papillomavirus type 31 differentiation-dependent late promoter. J. Virol., **79**:3309–3321.

. **Boettner M., Steffens C., von Mering C., Bork P., Stahl U., Lang C.** (2007). Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*- A comparative view on 79 human genes. J. Biotechnol., **130**:1-10.

. **Bosch A.** (2008). Expresión, caracterización y estudios de ensamblaje y agregación de la proteína L1 del Papilomavirus humano tipo 16 producida en *E.coli*. Tesis de licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.

. **Bosch F.X., Manos M.M., Muñoz N., Sherman M., Jansen A.M., Peto J., Schiffman M.H., Moreno V., Kurman R., Shah,** (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International and biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. J. Natl. Cancer Inst., **87**:796-802.

. **Bosch F.X., de Sanjosé S.** (2007). The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Dis. Markers, **23**:213-27.

. **Bosch F.X., Díaz M., de Sanjosé S., Font R., Castellsagué X., Albero G., Lloveras B., Klaustermeier J., Moreno V.** (2006). Epidemiología de las infecciones por virus del papiloma humano (VPH): riesgo de carcinoma cérvico-uterino y de otros tumores ano-genitales. Nuevas opciones preventivas. En: Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención. (4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología). de Sanjosé S. Gracia A.M. Madrid: EMISA. pp.30-50.

. **Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., zur Hausen, H.** (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO J., **3**:1151–1157.

. **Bousarghin L., Touze A., Combita-Rojas A.L., Coursaget P.** (2003). Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. J. Gen. Virol., **84**:157-164.

. **Burd E.M.** (2003). Human Papillomavirus and cervical cancer. Clin. Microbiol. Rev., **16**:1-17.

. **Campins M., Centeno C., Xercavins J.** (2007). Vacuna del papiloma humano y cáncer de cuello de útero. En: Virus del Papiloma humano y Cáncer de cuello de útero. Carreras R., Xercavins J. Y Checa M.A. Ed médica Panamericana. pp. 161-176.

. **Carter J.J., Koutsky L.A., Hughes J.P., Lee S.K., Kuypers J., Kiviat N., Gallogay D.A.** (2000). Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. J. Infect. Dis., **181**:1911-1919.

- . **Carter J.J., Wipf G.C., Benki S.F., Christensen N.D., Galloway D.A.** (2003). Identification of a Human Papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. *J. Virol.*, **77**:11625-11632.
- . **Carter J.J., Yaegashi N., Jenison S.A., Galloway D.A.** (1991). Expression of human papillomavirus proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology*, **182**:513-21.
- . **Casini G., Graham D., Heine D., Gracea R., Wu D.** (2004) In vitro papillomavirus capsid assembly analyzed by light scattering. *Virology*, **325**:320-327.
- . **Cason J., Kambo P.K., Jewers R.J., Best J.M.,** (1994). Detection of protein aggregates, but not virus-like particles, when the major (L1) coat protein of a wild-type human papillomavirus type 16 (HPV-16) is expressed in insect cells. *Biochem. Soc. Trans.*, **22**:335S.
- . **Castellsagué X., Albero G., Martí D., Plá M.J., Fernández P., Belloví C., Salinas M., Domínguez M., Roura E., Bosch F.X.** (2006). Prevención primaria: vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH) para la prevención del cáncer de cuello uterino. En: *Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención*. (4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología). de Sanjosé S. García A.M. Madrid: EMISA. pp.107-128.
- . **Castellsagué X., de Sanjosé S., Bosch F.X.** (2007). Epidemiología de la infección por VPH y del cáncer de cuello de útero. Nuevas opciones preventivas. En: *Virus del Papiloma humano y Cáncer de cuello de útero*. Carreras R., Xercavins J. Y Checa M.A. Ed médica Panamericana. pp. 1-25.
- . **Cereghino G.P.L., Cereghino J.L., Ilgen C., Cregg J.M.** (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**:329-332.
- . **Cereghino J.L., Cregg J.M.** (2000). Heterologous protein expresión in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**:45-66.
- . **Chang T., Schroder L.A., Thomson J.M., Klocman A.S., Tomasini A.J., Stromhaug P.E., Dunn W.A.** (2005). PpATG9 encodes a novel membrane protein that traffics to vacuolar membranes, wich sequester peroxisomes during pexophagy in *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Cel.*, **16**:4941-4953.
- . **Chen E.Y., Howley P.M., Levinson A.D., Seeburg P.H.** (1982). The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature*, **299**:529-534.
- . **Chen L., Sigler P.B.** (1999). The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell*, **99**:757-768.
- . **Chen X.S., Casini G., Harrison S.C., Garcea R.L.** (2001). Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J. Mol. Biol.*, **307**:173-182.
- . **Chen X.S., Garcea R.L., Goldberg I., Casini G., Harison C.** (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol. Cell*, **5**:557-567.
- . **Chiruvolu V., Cregg J.M., Meagher M.M.** (1997). Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *P.pastoris* in fed batch fermentations. *Ezyme Microb. Technol.*, **21**:277-283.

- . **Cho H.J., Hahm M.S., Kim M.K., Han I.K., Jung W.W., Choi H.G., Kim J.A., Oh Y.K.** (2007). Expression, purification, and antibody binding activity of human papillomavirus 16 L1 protein fused to maltose binding protein. *Protein Peptides Lett.*, **14**:417-24.
- . **Ciuffo G.** (1907). Innesso positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn. Ital. Mal. Venereol.*, **48**:12-17.
- . **Clifford G.M., Rana R.K., Franceschi S., Smith J.S., Gough G., Pimenta J.M.** (2005). Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **14**:1157-64.
- . **Cole S., Danos O.** (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J.Mol. Biol.*, **193**:599-608.
- . **Combata A.L., Bravo M.M., Touzé A., Orozco O., Coursaget P.**, 2002. Serologic response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 39, 58 and 59 Virus-Like Particles in colombian women with invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer*, **97**:796-803.
- . **Conrad M., Bubb V.J., Schlegel R.** (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.*, **67**:6170-6178.
- . **Cook J.C., Joyce J.G., George H.A., Schultz L.D., Hurni W.M., Jansen K.U., Hepler R.W., Ip Ch., Lowe R.S., Keller P.M., Lehman E.D.** (1999). Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expres. Purif.*, **17**:477-484.
- . **Cos O., Serrano A., Montesinos J.L., Ferrer P., Cregg J.M., Valero F.** (2005). Combined effect of the methanol utilization (Mut) phrnotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *J. Biotechnol.*, **116**:321-335.
- . **Coutlée F., Gravitt P., Konergay J., Hankins C., Richardson H., Lapointe N., Voyer H., The Canadian women's HIV group, Franco E.** (2002). Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J. Clin. Microbiol.*, **40**:902-907.
- . **Cregg J.M., Madden K.R.** (1988). Development of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, as a host system for production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol.*, **29**:33-41.
- . **Cregg J.M., Madden K.R.** (1989). Use of site-specific recombination to generate selectable markers. *Mol. Gen. Genet.*, **219**:320-323.
- . **Cregg J.M., Tschopp J.F., Stillman C., Siegel R., Akong M., Craig W.S., Buckholz R.G., Madden K.R., Kellaris P.A., Davis G.R., Smiley B.L., Cruze J., Torregrosa R., Velicelebi G., Thill G.P.** (1987). High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.*, **5**:479-485.
- . **Cregg J.M., Vedvick T.S., Rasehke W.C.** (1993). Recent advantages in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.*, **11**:905-910.
- . **Cueille N., Nougarede R., Mechali F., Philippe M., Bonne-Andrea C.** (1998). Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J. Virol.*, **72**:7255-7262.

- . **Cullen A., Reid R., Campion M., Lörincz A.** (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol.*, **65**:606-612.
- . **Cunha A.E., Clemente J.J., R. Gomes R., Pinto F., Thomaz M., Miranda S., Pinto R., Moosmayer D., Donner P., Carrondo M.J.T.** (2004). Methanol Induction Optimization for scFv Antibody Fragment Production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.*, **4**:458-467.
- . **Daly R., Hearn M.T.W.** (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.*, **18**:119-138.
- . **Danos O., Katinka M., Yaniv M.** (1982). Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.*, **1**:231-236.
- . **Davis T.R., Wickham T.J., McKenna K.A., Granados R.R., Shuler M.L., Wood H.A.** (1993). Comparative recombinant protein production in eight insect cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **29A**:388-390.
- . **DeLong L.J., Bonamy G.C.M., Fink E.N., Allison L.A.** (2004). Nuclear Export of the Oncoprotein v-ErbA is Mediated by Acquisition of a Viral Nuclear Export Sequence. *J.Biol.Chem.*, **279**:15356-15367.
- . **de Sanjosé S.** (2006). La investigación sobre la infección por virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer de cuello de útero en España. En: *Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención. (4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología)*. de Sanjosé S. García A.M. Madrid: EMISA. pp.141-6.
- . **de Sanjosé S., Almirall R., Lloveras B., Font R., Díaz M., Muñoz N., Català I., Meijer C.J., Snijders P.J., Herrero R., Bosch F.X.** (2003). Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex. Transm. Dis.*, **30**:788-793.
- . **de Villiers E.M.** (1998). Human papillomavirus infections in skin cancers. *Biomed. Pharmacother.*, **52**:26-33.
- . **de Villiers E. M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H.** (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, **324**:17-27.
- . **de Villiers, E.-M., Gissmann, L., zur Hausen, H.** (1981). Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J. Virol.*, **40**:932-935.
- . **Di Bonito P., Grasso F., Mochi S., Accardi L., Dona M. G., Branca M., Costa S., Mariano L., Agarossi A., Ciotti M., Syrjanen K., Giorgi C.** (2006). Serum antibody response to Human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins. *Infect. Agent. Cancer*, **8**:1-6.
- . **Dillner J.** (2006). Toward “serolomics”: papillomavirus serology is taking a technology lead in high-throughput multiplex antibody analysis. *Clin. Chem.*, **51**:1768-1769.
- . **Doorbar J.** (2007). Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis. Markers*, **23**:297-313.
- . **Dumon-Seignovert L., Guillaume C., Vuillard L.** (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpresion in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expres. Purif.*, **37**:203-206.

- . **Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., zur Hausen, H.** (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *PNAS*, **80**:3812–381.
- . **Emini E.A., Hughes J., Perlow D., Boger J.** (1985). Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.*, **55**: 836-839.
- . **Evander M., Frazer I.H., Payne E., Qi Y.M., Hengst K., McMillan N.A.** (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.*, **71**:2449-2456.
- . **Farnós O., Boué O., Parra F., Martín-Alonso J.M., Valdés O., Juglar M., Navea L., Naranjo P., Leonart R.** (2005). High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein obtained in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.*, **117**:215-224.
- . **Feissner R.E., Richard-Fogal C.L., Frawley E.R., Loughman J.A., Earley K.W., Kranz R.G.** (2006) Recombinant cytochromes *c* biogenesis systems I and II and analysis of haem delivery pathways in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **60**:563-577.
- . **Ferenczy A., Mitao M., Nagai N., Silverstein S.J., Crum C.P.** (1985). Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N. Engl. J. Med.*, **313**:784-788.
- . **Ferguson M., Heath A., Johnes S., Pagliusi S., Dillner J.** (2006). Results of the first WHO international collaborative study on the standardization of the detection of antibodies to human papillomaviruses. *Int. J. Cancer.*, **118**:1508-14.
- . **Ferlay J., Bray P., Pizani P., Parker D.M., GLOBOCAN** (2002): Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase No 5, Version 2.0, Lyon: IARCPress,
- . **Florin L., Sapp C., Streeck R.E., Sapp M.** (2002). Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J. Virol.*, **76**:10009-10014.
- . **Franco E.L.** (1996). Epidemiology of anogenital warts and cancer. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.*, **23**:597-623.
- . **Frappart L., Fontanière B., Lucas E., Sankaranarayanan, R.** (2004). Histopathology and Cytopathology of the Uterine Cervix. IARC. Atlas digital.
- . **Gambhira R., Jagu S., Karanam B., Gravitt P.E., Culp T.D., Christensen N.D., Roden R.B.S.** (2007). Protection of rabbits against challenge with rabbit papillomaviruses by immunization with the N terminus of Human Papillomavirus type 16 minor capsid antigen L2. *J. Virol.*, **81**:11585-11592.
- . **Galceran J., Marcos-Gragera R., Izquierdo A., Borrás J.** (2006). Carcinoma invasor y lesiones premalignas del cuello uterino en los registros poblacionales: utilidad y limitaciones. En: Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención. (4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología). de Sanjosé S. Gracía A.M. Madrid: EMISA. pp.15-29.
- . **Gatignhol A., Durand H., Tirabi G.** (1988). Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett.* **230**:171-175.

- . **Ghim S., Newsome J., Sundberg J.P., Schlegel R., Jenson A.B.** (2000). Spontaneously regressing oral papillomas induce systemic antibodies that neutralize canine oral papillomavirus. *Exp. Mol. Pathol.*, **68**:147–51.
- . **Gillison M.L.** (2004). Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin. Oncol.*, **31**:744-754.
- . **Gissmann, L., zur Hausen, H.** (1980). Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int. J. Cancer.*, **25**:605–609.
- . **Granados R.R., Li G., Blissard G.W.** (2007). *Insect Cell Culture and Biotechnology*. *Virologica Sinica*, **22**:83-93.
- . **Gravitt P.E., Shah K.V.** (2004) The biology of human papillomavirus infection. En: *Cervical Cancer: From Etiology to Prevention*. Rohan T.E. Hingham, MA, USA: Kluwer Academic Publishers. pp. 81-99.
- . **Gravitt P.E., Peyton C.L., Alessi T.Q., Wheeler C.M., Coutlée F., Hildesheim A., Schiffman M.H., Scott D.R., Apple R.J.** (2000). Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.*, **38**:357-361.
- . **Gurkan C., Ellar D.J.** (2003). Expression in *Pichia pastoris* and purification of a membrana-actin immunotoxin based on a synthetic gene coding for the *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa1 toxin. *Prot. Expres. Purif.*, **29**:103-116.
- . **Hanslip S., Zaccai N., Middelberg A., Falconer R. J.** (2006). Assembly of human papillomavirus type-16 virus-like particles: Multifactorial study of assembly and competin aggregation. *Biotechnol. Prog.*, **22**:554-560.
- . **Harper D.M., Franco E.L., Wheeler C., Ferris D.G., Jenkins D., Schuind A., et al.** (2004). Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet*, **364**:1757-1765.
- . **Harper D.M., Franco E.L., Wheeler C.M., Moscicki A.B., Romanowski B., Roteli-Martins C.M., Teixeira J., Blatter M.M., Korn A.P., Quint W., Dubin G., GlaxoSmithKline HPV Vaccine Study Group.** (2006). Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow up from a randomized control trial. *Lancet*, **367**:1247-55.
- . **Healey S.M., Aronson K.J., Mao Y., Schlect N.F., Mery L.S., Ferenczy A., Franco E.L.** (2001). Oncogenic human papillomavirus infection and cervical lesions in aboriginal women of Nunavut, Canada. *Sex. Trans. Dis.*, **28**: 694-700.
- . **Henikoff S., Coehn E.H.** (1984). Sequences responsible for transcription termination on a gene segment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Biol.* **4**:1515-1520.
- . **Higgins D.R., Cregg J.M.** (1998). *Pichia* protocols. *Meth. Mol. Biol.* **103**. Humana Press.
- . **Ho G.Y.F., Bierman R., Beardsley L., Chang C.J., Burk R.D.** (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med.*, **338**:423-28.
- . **Hober S. and Uhlen M.** (1999). En: *Protein engineering in industrial biotechnology* (Alberghina, L, ed) Harwood academic publishers, Amsterdam, netherlands, pp. 24-39.

- . **Hofmann K. J., Cook J.C., Joyce J.G., Brown D.R., Schultz L.D., George H.A., Rosolowsky M., Fife K.H. y Jansen U.K.** (1995). Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology*, **209**:506–518.
- . **Howley P.M., Lowy D.R.** (2007). Papillomaviruses. En: *Fields Virology Vol 2*, 5ª. Knipe D.M. & Howley P.M. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 2299-2354.
- . **Hubert W.G.** (2005). Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *J. Virol.*, **79**:5914-5922.
- . **Huibregtse J.M., Scheffner M., Howley P.M.** (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.*, **10**:4129-4135.
- . **Huibregtse J.M., Scheffner M., Howley P.M.** (1993). Cloning and expression of the cDNA for E6-AP: a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.*, **13**:775-784.
- . **Jameson B.A., Wolf H.** (1988). The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *CABIOS*, **4**:181-186.
- . **Joyce J.G., Tung J.S., Przysiecki C.T., Cook J.C., Lehman E.D., Sands J.A., Jansen K.U., Keller P.M.** (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant viruslike particles interacts with heparin and cell surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, **274**:5810–5822.
- . **Kalantari M., Blennow E., Hagmar B., Johansson B.** (2001). Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn. Mol. Pathol.*, **10**: 465-474.
- . **Kammer C., Warthorst U., Torrez-Martinez N., Wheeler C.M., Pfister H.** (2000). Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J. Gen. Virol.*, **81**:1975-1981
- . **Kamper N., Day P.M., Nowak T., Selinka H.C., Florin L., Bolscher J., Hilbig L., Schiller J.T., Sapp M.** (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J. Virol.*, **80**:759-768.
- . **Karem K., Poon A., Bierl C., Nisenbaum R., Unger E.** (2002). Optimization of human papillomavirus-specific enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **3**:577-582.
- . **Kay P., Meehan K., Williamson A.L.** (2002). The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J. Virol. Methods.*, **105**:159-170.
- . **Khan M.J., Castle P.E., Lorincz A.T., Wacholder S., Sherman M., Scott D.R., Rush B.B., Glass A.G., Schiffman M.** (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **97**:1072-1079.

- . **Kim S.N., Jeong H.S., Park S.N., Kim H.J.** (2007). Purification and immunogenicity study of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol. Methods.*, **139**:24-30.
- . **Kioukia N., Nienow A.W., Emery A.N., Al-Rubeai M.** (1995). Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus. *J. Biotechnol.*, **38**:243-253.
- . **Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowy D.R., Schiller J.T.** (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *PNAS*, **89**:12180-12184.
- . **Kitts P.A., Possee R.D.** (1993). A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques*, **14**:810-817.
- . **Kniskern P.J., Hagopian A., Montgomery D.L., Burke P., Dunn N.R., Hofmann K.J., Miller W.J., Ellis R.W.** (1986). Unusually high-level expression of a foreign gene (hepatitis B virus core antigen) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **46**:135-141.
- . **Kónya J., Veress G., Juhász A., Szarka K., Sápy T., Hernádi Z., Gergely L.** (2000). Additional human papillomavirus types detected by the Hybrid Capture Tube Test among samples from women with cytological and colposcopic atypia. *J. Clin. Microbiol.*, **36**:408-411.
- . **Kost T.A., Condreay J.P., Jarvis D.L.** (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, **23**:567-575.
- . **Koutsky L.A., Holmes K.K., Critchlow C.W., Stevens C.E., Paavonen J., Beckmann A.M., DeRouen T.A., Galloway D.A., Vernon D., Kiviat N.B.** (1992). A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N. Engl. J. Med.*, **327**:1272-1278.
- . **Kyte, J., Doolittle, R.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**: 105-132.
- . **Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- . **Le Cann P., Coursaget P., Iochmann S., Touze A.** (1994). Self-assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, **117**:269-74.
- . **Ledder C., Kleinschmidt J.A., Wiethe C., Müller M.** (2001). Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes. *J. Virol.*, **75**:9201-9209.
- . **Li M., Cripe T.P., Estes P.A., Lyon M.K., Rose R.C., Garcea R.L.** (1997). Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J. Virol.* **71**:2988-2995.
- . **Li P.C., Zhang X.G., Zhou L., Zeng Y.** (2003). Gene optimization is necessary to express HPV type 6 L1 protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Chin. J. Exp. Clin. Virol.*, **17**:310-4 (artículo en chino con resumen en inglés).

- . Liaw K.L., Glass A.G., Manos M.M., Greer C.E., Scott D.R., Sherman M., Burk R.D., Kurman R.J., Wacholder S., Rush B.B., Cadell D.M., Lawler P., Tabor D., Mark Schiffman M. (1999) Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J. Natl. Cancer Inst.*, **91**: 954-960.
- . Liddington R.C., Yan Y., Moulai J., Sahli R., Benjamin T.L., Harrison S.C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8 Å resolution. *Nature*, **354**:278-284.
- . Lin P., Koutsky L.A., Critchlow C.W., Apple R.J., Hawes S.E., Hughes J.P., Touré P., Dembele A., Kiviat N.B. (2001). HLA class II DR-DQ and increased risk of cervical cancer among Senegalese women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **10**: 1037-1045.
- . Liu J-S, Kuo S.R., Broker T.R., Chow L.T. (1995) The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J. Biol. Chem.*, **270**:27283-27291.
- . Lowy D.R., Schiller J.T. (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J. Clin. Invest.*, **116**:1167-1173.
- . Mach H., Volkin D., Troutman R., Wang B., Luo Z., Jansen K., Shi L. (2006). Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLP's). *J. Pharm. Sci.*, **95**:2195-2206.
- . Marais D.J., Best J.M., Rose R.C., Keating P., Soeters R., Denny L., Dehaeck C.M., Nevin J., Kay P., Passmore J.A., Williamson A.L. (2001). Oral antibodies to human papillomavirus type 16 in women with cervical neoplasia. *J. Medical Virol.*, **65**:149-54.
- . Maranga L., Coroadinha A.S., Larrondo M.J.T. (2002). Insect cell cultura medium supplementation with fetal bovine serum and bovine serum albumin: effects on baculovirus adsorption and infection kinetics. *Biotechnol. Prog.*, **18**: 855-861.
- . Marston F.A. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochemical J.*, **240**:1-12.
- . Martinez-Donato G., Acosta-Rivero N., Morales-Grillo J., Musacchio A., Vina A., Alvarez C., Figueroa N., Guerra I., Garcia J., Varas L., Muzio V., Dueñas-Carrera S. (2006). Expression and processing of hepatitis C virus structural proteins in *Pichia pastoris* yeast. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **324**:625-631.
- . Matlashewski G., Banks L., Wu-Liao J., Spence P., Pim D., Crawford L. (1986). The Expression of Human Papillomavirus Type 18 E6 Protein in Bacteria and the Production of Anti-E6 Antibodies. *J. Gen. Virol.*, **67**:1909-1916.
- . McBride A.A., Romanczuk H., Howley P.M. (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J. Biol. Chem.*, **266**:18411-18414.
- . McCarthy M.P., White W.I., Palmer Hill F., Koenig S., Suzich J.A. (1998). Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 viruslike particles in vitro. *J. Virol.*, **72**:32-41.
- . Meissner J. (1997). Sequencing errors in references HPV clones. In: Myers G., Baker C., Munger K., Sverdup F., McBride A., Bernard H.U. Analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, pp. III-110-III123.

- . Meschede W., Zumbach K., Braspenning, Scheffner M., Benitez-Bribiesca L., Luande J., Guissmann L., Pawlita M. (1998). Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.*, **36**:457-480.
- . Milek R.L.B., Stunnenberg H.G., Konings R.N.H. (2000). Assembly and expression of a synthetic gene encoding the antigen Pfs48/45 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in yeast. *Vaccine*, **18**:1402-1411.
- . Miroux B., Walker J. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.*, **260**:289-298.
- . Modis Y., Trus B.L., Harrison S. (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.*, **21**:4754-4762.
- . Mossadegh N., Gissmann L., Müller M., Zentgraf H., Alonso A., Tomakidi P. (2004). Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV 11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells. *Virology*, **326**:57-66.
- . Motoyama S., Ladines-Llave C.A., Villanueva S.L., Maruo T. (2004). The role of human papillomavirus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *J. Med. Sci.*, **50**:9-19.
- . Múgica-Van Herckenrode C., Malcolm A.D., Coleman D.V. (1992). Prevalence of human papillomavirus (HPV) infection in Basque Country women using slot-blot hybridization: a survey of women at low risk of developing cervical cancer. *Int. J. Cancer*, **51**:581-6.
- . Munger K., Baldwin A., Edwards K.M., Hayakawa H., Nguyen C.L., Owens M., Grace M., Huh K.W. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.*, **78**:11451-11460.
- . Muñoz N. (2000). Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J. Clin. Virol.*, **19**:1-5.
- . Muñoz N., Bosch X., Castellsagué X., Díaz M., de Sanjosé S., Shah K.V., Meijer C.J.L.M. (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int. J. Cancer*, **111**:278-285.
- . Muñoz N., Bosch X., de Sanjosé S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K.V., Snijders P.J.F., Meijer C.J.L.M. (2003). Epidemiologic classification of Human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, **348**:518-527.
- . Neeper M.P., Hofmann K.J., Jansen K.U. (1996). Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **180**:1-6.
- . Ogata K., Nishikawa H., Ohsugi M. (1969). A yeast capable of utilizing methanol. *Agric. Biol. Chem.*, **33**:1519-1520.
- . Oh S.T., Kyo S., Laimins L.A. (2001). Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J. Virol.*, **75**:5559-5566.

- . **Oh S.T., Longworth M.S., Laimins L.A.** (2004). Roles of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11. *J. Virol.*, **78**:2620-2626.
- . **Olcese V.A., Chen Y., Schlegel R., Yuan H.** (2004). Characterization of HPV16 L1 loop domains in the formation of a type-specific, conformational epitope. *BMC Microbiol.*, **4**:29-40.
- . **Ordoñez R.M., Espinosa A.M., Sanchez-Gonzalez D.J., Armendariz-Borunda J., Berumen J.** (2004). Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J. Gen. Virol.*, **85**:1433-1444.
- . **Orth G., Jablonska S., Favre M., Croissant O., Jarzabek-Chorzelska M., Rzeska G.** (1978). Characterization of two types of human papillomaviruses in lesion of epidermodysplasia verruciformis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**:1537-1541.
- . **Ortiz M., Torres M., García-Sáiz A.** (2006). Determinación del virus del papiloma humano (VPH): aspectos técnicos. En: *Virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención*. (4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología). de San José S. García A.M. Madrid: EMISA. pp.89-105.
- . **Ozbun M.A., Meyers C.**, (1998) Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J. Virol.*, **72**:2715-2722.
- . **Pagliusi S.R. & Garland S.M.** (2007). International standard reagents for HPV detection. *Dis. Markers*, **23**:283-296.
- . **Papanicolaou G.N.** (1942). A new procedure for staining vaginal smears. *Science*, **24**:438-439.
- . **Park J.S., Hwang E.S., Park S.N., Ahn H.K., Um S.J., Kim C.J., Kim S.J., Namkoong S.E.** (1997). Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol. Oncol.*, **65**:121-129.
- . **Park J.Y., Pyo H.M., Yoon S.W., Baek S.Y., Park S.N., Kim C.J., Poo H.**, (2002). Production and Prophylactic Efficacy Study of Human Papillomavirus-like Particle Expressing HPV16 L1 Capsid Protein. *J. Microbiol.*, **40**:313-318.
- . **Parkin D.M.** (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer*, **118**:3030-3044.
- . **Payne W.E., Kaiser C.A., Bevos B.J., Soderholm J., Fu Dragony, Sears I.B., Glick B.S.** (2000). Isolation of *Pichia pastoris* genes involved in ER-to-Golgi transport. *Yeast*, **16**:979-993.
- . **Peh W.L., Middleton K., Christensen N., Nicholls P., Egawa K., Sotlar K., Brandsma J., Percival A., Lewis J., Liu W.J., Doorbar J.** (2002). Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J. Virol.*, **76**:1001-10416.
- . **Peixoto C., Sousa M.F.Q., Silva A.C., Carrondo M.J.T., Alves P.M.** (2007). Downstream processing of triple layered rotavirus like particles. *J. Biotechnol.*, **127**:452-461.
- . **Peyton C.L., Schiffman M., Lörincz A.T., Hunt W.C., Mielzynska I., Bratti C., Eaton S., Hildesheim A., Morera L.A., Rodríguez A.C., Herrero R., Sherman M.E., Wheeler M.C.** (1998). Comparison of PCR- and Hybrid Captured-Based human papillomavirus detection

systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J. Clin. Microbiol.*, **36** :3248-3254.

. **Philipps B., Rotmann D., Wicki M., Mayr L.M., Forstner M.** (2005). Time reduction and process optimization of the baculovirus expression system for more efficient recombinant protein production in insect cells. *Protein Expres. Purif.*, **42**:211-218.

. **Poljak M., Brencic A., Seme K., Vince A., Marin I.J.** (1999). Comparative evaluation of first- and second-generation Digene Hybrid Capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.*, **37** :796-797.

. **Poljak M., Marin I.J., Seme K., Vince A.** (2002). Hybrid Capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J. Clin. Virol.*, **25** :S89-S97.

. **Power J.F., Reid. S., Greenfield P.F., Nielsen L.K.** (1996). The kinetics of baculovirus adsorption to insect cells in suspension culture. *Cytotechnology*, **21**:155-163.

. **Prendiville W, Davies P.** (2004). The Human Papillomavirus. En: The Health Professionals HPV Handbook: Human papillomavirus and cervical cancer. Prendiville W., Davis P. Ed. Oxford: Taylor and Francis. pp: 11-26.

. **Puig-Tintoré L.M., Cortés J., Castellsagué X., Torné A., Ordi J., De Sanjosé S., Alonso I., Cararach M., Vidart J.A., Alba A., Martínez-Escoriza J.C., Coll C., Vilaplana E., Hardisson D., Bosch X.** (2006). Prevención del cáncer de cuello de útero ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Prog. Obstet. Ginecol.*, **49**:5-62.

. **Qu W., Hang G., Cruz Y., Chang C.J., Ho G.Y.F., Klein R.S., Burk R.D.** (1997). PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J. Clin. Microbiol.*, **35**:1304-1310.

. **Reverter D., Ventura S., Villegas V., Vendrell J., Aviles F.X.** (1998). Overexpression of human procarboxypeptidase A2 in *Pichia pastoris* and detailed characterization of its activation pathway. *J. Biol. Chem.*, **273**: 3535–3541.

. **Rieder S.E., Banta L.M., Correr K., McCaffery J.M., Emr S.D.** (1996). Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast *vps28* vacuolar protein sorting mutant. *Mol. Biol. Cel.*, **7**:985-999.

. **Rivera R., Delgado J., Painel V., Barrero R., Larraín A.** (2006). Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el eptelio cervical. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.*, **71**:135-140.

. **Rocha-Zavaleta L., Ambrosio J., Mora-Garcia M.L., Wiss.Steider B., Ortiz-Navarrete V. y Monroy Garcia A.** (2004). Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate low grade squamous intraepithelial lesions. *J. Gen. Virol.*, **85**:2643-2650.

. **Roden R., Day M., Bronzo B., Iv W.H, Yang Y., Lowy D.R., Schiller J.T.** (2001). Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus Infection. *J.Virol.*, **75**: 10493–10497.

- . **Romanos M.A., Scorer C.A., Clare J.J.**, (1992). Foreign gene expression in yeast: A review. *Yeast*, **8**:423-488.
- . **Romanos M., Scorer C., Sreekrishna K., Clare J.** (1998). The generation of multicopy recombinant strains. *Methods Mol. Biol.*, **103**:55-72.
- . **Rose R.C., Bonnez W., Reichman R.C., Garcea R.L.** (1993). Expression of Human Papillomavirus Type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of Viruslike Particles. *J. Virol.*, **67**:1936-1944.
- . **Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** (1989). Plasmid vectors. En: *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press 2nd ed., pp:74-110.
- . **Sapp M., Volpers C., Muller M., Streek R.E.** (1995). Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J. Gen. Virol.*, **76**: 2407-2412.
- . **Schäfer F., Florin L., Sapp M.** (2002). DNA binding of L1 is required for human papillomavirus morphogenesis *in-vivo*. *Virology*, **295**:172-181.
- . **Schiffman M., Herrero R., Desalle R., Hildesheim A., Wacholder S., Rodriguez A.C., Bratti M.C., Sherman M.E., Morales J., Guillén D., Alfaro M., Hutchinson M., Wright T.C., Solomon D., Chen Z., Schussler J., Castle P.E., Burk R.D.** (2005). The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, **337**:76-84.
- . **Schiffman M., Herrero R., Hildesheim A., Sherman M.E., Bratti M., Wacholder S., Alfaro M., Hutchinson M., Morales J., Greenberg M.D., Lorincz A.T.** (2000). HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA*, **283**: 879-883.
- . **Schlaeger E.J.** (1996). Medium design for insect cell culture. *Cytotechnology*, **20**:57-70.
- . **Schiller J.T., Davies P.** (2004). Delivering on the promise: HPV vaccine and cervical cancer. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**:343-347.
- . **Schmitt H.J., Kaufmann A.M., Schneider A.** (2007) Should all women be vaccinated against HPV? *Pol. Arch. Med Wewn.*, **117**:448-451.
- . **Schwarz, E., Durst, M., Demankowski, C., Lattermann, O., Zech, R., Wolfspurger, E., Suhai, S., zur Hausen, H.** (1983). DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J.*, **2**:2341-2348.
- . **Scorer C.A., Buckholz R.G., Clare J.J., Romanos M.A.** (1993). The Intracellular Production and Secretion of HIV-1 Envelope Protein in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, **136**:111-119.
- . **Sehr P., Zumbach K., Pawlita M.** (2001). A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation of HPV serology. *J. Immunol. Methods*, **253**:153-162.
- . **Sehr P., Müller M., Höpfl R., Widschwendter A., Pawlita M.** (2002). HPV antibody detection by ELISA with capsid protein L1 fused to glutathione S-transferase. *J. Virol. Methods*, **106**:61-70.

- . **Sherman M.E., Schiffman M., Cox J.T.** (2002). Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized atypical squamous cells of undetermined significance/ low-grade squamous intraepithelial lesion triage study (ALTS). *J. Natl. Cancer Inst.*, **94**:102-107.
- . **Shi L., Sanyal G., Ni A., Luo Z., Doshna S., Wang B., Graham T.L., Wang N., Volkin D.B.** (2005). Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants. *J. Pharm. Sci.*, **94**:1538-1551.
- . **Shope R.E., Hurst E.W.** (1933). Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. *J. Exp. Med.*, **58**:607-624.
- . **Smith D.B. y Corcoran L.M.** (1990). En: Current protocols in molecular biology Vol 2, eds John Wiley and Sons, pp. 16-71.
- . **Solomon D., Davey D., Kurman R., Moriarty A., O'Connor D., Prey M., Raab S., Sherman M., Wilbur D., Wright T., Young N.** (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.*, **287**:2114-1119.
- . **Spink, K.M., Laimins, L.A.** (2005). Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification. *J. Virol.*, **79**: 4918–4926.
- . **Sreekrishna K., Brankamp R.G., Kropp K.E., Blankenship D.T., Tsay J.Y., Smith P.L., Wierschke J.D., Subramaniam A., Birkenberger L.A.**, (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, **190**:55-62.
- . **Stanley M.** (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, **24S1**: S1/16-S1/22.
- . **Stubenrauch F., Laimins L.A.**, (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer. Biol.*, **9**:379-386.
- . **Studentsov Y.Y., Schiffman M., Strickler H.D., Ho Y.F., Pang Y.Y.S., Schiller J., Herrero R., Burk R.D.** (2002). Enhance enzyme-lynked immunosorbent assay for detection of antibodies to virus-like particles of human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.*, **40**:1755-1760.
- . **Studentsov Y.Y., Ho G.Y.F., Marks M.A., Bierman R., Burk R.D.** (2003). Polymer-based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using human papillomavirus type 16 (HPV16) Virus-Like Particles detects HPV16 clade-specific serologic responses. *J.Clin. Microbiol.*, **41**:2827-2834.
- . **Sugimura K., Higashi N.** (1988). A novel outer-membrane-associated protease in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**:3650-4.
- . **Sugrue R.J., Gu J., Howe J., Chan Y.C.** (1997). Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.*, **78**:1861-1866.
- . **Sun C.A., Lai H.C., Chang C.C., Neih S., Yu C.P., Chu T.Y.** (2001). The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix. *Gynecol. Oncol.*, **83**:95-99.
- . **Swan D., Tucker R., Tortolero-Luna G., Mitchell M.F., Wideroff L., Unger E.R., Nisenbaum R.A., Reeves W.C., Icenogle J.P.** (1999). Human papillomavirus (HPV) DNA

copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J. Clin. Microbiol.*, **37**:1030-1034.

. **Swiatek W., Sugajska E., Lankiewica L., Hemmings B.A., Zolnierowicz S.** (2000). Biochemical characterization of recombinant subunits of type 2A protein phosphatase overexpressed in *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.*, **267**:5209-5216.

. **Thill G.P., Davis G.R., Stillman C., Holtz G., Brierley R., Engel M., Buckholtz R., Kinney J., Provow S., Vedvick T. Siegel R.S.** (1990) Positive and negative effects of multicopy expression integrated vectors on protein expression in *Pichia pastoris*, En: Proceedings of the 6th international symposium on genetics of microorganisms. Hestlot H., Davies J., Florent J., Bobichon L., Durand G., Penasse L. Societe Francaise de Microbiologie, Paris. Vol 2, pp.477-490.

. **Thorland E.C., Myers S.L., Persing D.H., Sarkar G., McGovern M.R., Gostout B.S., Smith D.I.** (2000). Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res.*, **60**: 591621.

. **Touzé A., Mahé D., El Mehdaoui S., Dupuy C., Combata-Rojas A.L., Bousarghin L., Sizaret P.Y., Coursaget P.** (2000). The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity. *FEMS Microbiol. Lett.*, **189**:121-127.

. **Touzé A., Mehdaoui S., Sizaret P.Y., Mougin Ch., Muñoz N., Coursaget P.** (1998). The L1 Mayor Capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system. *J. Clin. Microbiol.*, **36**:2046-2051.

. **Touzé A., Sanjosé S., Coursaget P., Almirall M.R., Palacio V., Meijer C.J.L.M., Kornegay J., Bosch F.X.** (2001). Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18, 31, and 58 Virus-Like Particles in women in the general population and prostitutes. *J. Clin. Microbiol.*, **39**:4344-4348.

. **Trottier H., Franco E.L.** (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, **24S1**:S1/4-S1/15.

. **Trus B.L., Roden B.S., Greenstone H.L., Vrhel M., Schiller J.T. Booy F.P.** (1997) Novel structural features of bovine papillomavirus revealed by a three dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.*, **4**:413-420.

. **Tschopp J.F., Sverlow G., Kosson R., Craig W., Grinna L.** (1987). High level secretion of glycosylated invertase in the metilotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.*, **5**:1305-1308.

. **van der Graaf Y., Vooijs G.P., Gaillard H.L., Go D.M.** (1987). Screening errors in cervical cytologic screening. *Acta Cytol.*, **31**:434-438.

. **Varsani A., Williamson A.L., Stewart D., Rybicki E.** (2006). Transient expression of Human papillomavirus type 16L1 protein in *Nicotiana benthamiana* using an infectious tobamovirus vector. *Virus Res.*, **120**:91-6.

. **Vieira H.L.A., Estêvão C., Roldão A., Peixoto C.C., Sousa M.F.Q., Cruz P.E., Carrondo M.J.T., Alves P.M.** (2005). Triple layered rotavirus VLP production: kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *J.Biotechnol.*, **120**:72-82.

- . Villa L.L., Costa R.L.R., Petta C.A., Andrade R.P., Ault K.A., Giuliano A.R., Wheeler C.M., Koutsky L.A., Malm C., Lehtinen M., Skjeldstad F.E., Olsson S.E., Steinwall M., Brown D.R., Kurman R.J., MRonnett B., Stoler M.H., Ferenczy A., Harper D.H., Tamms G.M., Yu J., Lupinacci L., Railkar R., Taddeo F.J., Jansen K.U., Esser M.T., Sings H.L., Saah A.J., Barr E. (2005). Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet. Oncol.*, **6**:271–8.
- . Viscidi R.P., Schiffman M., Hildesheim A., Herrero R., Castle P.E., Bratti M.C., Rodriguez A.C., Sherman M.E., Wang S., Clayman B., Burk R.D. (2004). Seroreactivity to Human Papillomavirus (HPV) Types 16, 18, or 31 and Risk pf Subsequent HPV Infection: Results from a Population-Based Study in Costa Rica. *Cancer Epid. Biomarkers Prev.*, **13**:324-327.
- . von Krogh G. (2001). Management of anogenital warts (condyloma acuminata). *Eur. J. Dermatol.*, **11**:598-603.
- . Walboomers J.M.M., Jacobs M.V., Manos M.M., Bosch F.X., Kummer J.A., Shah K.V., Snijders P.J.F., Peto J., Meijer C.J.L.M., Muñoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.*, **189**:9-12.
- . Wallin K.L., Wiklund F., Angstrom T., Bergman F., Stendahl U., Wadell G., Hallmans G., Dillner J. (1999). Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, **341**: 1633-1638.
- . Wang X., Sapp M., Christensen N.D., Dillner J. (2005). Heparin-based ELISA reduces background reactivity in virus-like particle-based papillomavirus serology. *J. Gen. Virol.*, **86**:65-73.
- . Wang B.N., Shi Q.F., Li H., Zhang W.D., Zhang Y.H., Yang J., Jiang Z.H., Li M.Y. (2006). Analysis of protein expression feature and construction of procaryotic expression system for human papillomavirus type 16 (HPV16) E4 gene. *J. Sichuan Univ.*, **37**:361-364 (artículo en chino con resumen en inglés).
- . Wang X., Wang Z., Christensen N.D., Dillner J. (2003). Mapping of human serum-reactive epitopes in virus-like particles of human papillomavirus types 16 and 11. *Virology*, **311**:213-221.
- . Watelet B., Quibriac M., Rolland D., Gervasi G., Gauthier M., Jolivet M., Leturneur O. (2002). Characterization and diagnostic potential of hepatitis B virus nucleocapsid expressed in *E.coli* and *P.pastoris*. *J. Virol. Methods*, **99**:99-114.
- . Waterboer T., Sehr P., Michael K.M., Franceschi S., Nieland J.D., Joos T.O., Templin M.F., Pawlita M. (2005). Multiplex Human Papillomavirus Serology Based on In Situ-Purified Glutathione S-Transferase Fusion Proteins. *Clin. Chem.*, **51**:1845-1853.
- . Walboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M., Bosch F.X., Kummer J.A., Shah K.V., Snijders P.J., Peto J., Meijer C.J., Muñoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.*, **189**:12-19.
- . Webb E., Cox J., Eduwards S. (2005). Cervical cancer-causing human papillomaviruses have an alternative initiation site for the L1 protein. *Virus Genes*, **30**:31-35.
- . Weissman J. S., Kashi Y., Fenton W. A. & Horwich A. L. (1994). GroEL-mediated protein folding proceeds by multiple rounds of binding and release of nonnative forms. *Cell*, **78**:693-702..

- . **Weissman J.S., Hohl C.M., Kovalenko O., Kashi Y., Chen S., Braig K., Saibil H.R., Fenton W.A., Horwich A.L.** (1995). Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell*, **83**:577-587.
- . **Williams G.S.M., Disbrow G.L., Schlegel R., Lee D., Threadgill D.W., Lambert P.F.** (2005). Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer. Res.*, **65**:6534-6542.
- . **Wooldridge T.R., Laimins L.A.** (2008). Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding. *Virology*, **374**:371-380.
- . **Xi S.Z., Banks L.M.** (1991). Baculovirus expression of the human papillomavirus type 16 capsid proteins: detection of L1-L2 protein complexes. *J. Gen. Virol.* **72**:2981-2988.
- . **Xia M., Farkas T., Jiang X.** (2007). Norovirus capsid protein expressed in yeast forms Virus-like particles and stimulates systemic and mucosal immunity in mice following an oral administration of raw yeast extracts. *J. Med. Virol.*, **79**:74-83.
- . **Zhang W., Carmichael J., Ferguson J., Inglis S., Ashrafian H., Stanley M.** (1998). Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Escherichia coli*: denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles in vitro. *Virology*. **243**:423-31.
- . **Zhang B., Li P., Wang E., Brahmi Z., Dunn K.W., Blum J.S., Roman A.** (2003). The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*, **310**:100-108.
- . **Zhao Q., Gou H., Wang Y., Washabaugh M. W., Sitrin R. D.** (2005). Visualization of discrete L1 oliomers in human papillomavirus 16 virus-like particles by gel electrophoresis with Coomassie staining. *J. Virol. Methods*, **127**:133-140.
- . **Zheng J., Ma J., Yang X.F., Liu H.L., Cheng H.W., Si L.S., Wang Y.L.** (2004). Highly efficient and economical baculovirus expression system for preparing Human Papillomavirus type16 Virus-like Particles. *Acta Biochim. Biophys.*, **36**:548-552.
- . **Zhou J., Crawford L., McLean L., Xiao-yi S. Stanley M., Almond N., Smith L.S.** (1990). Increased antibody responses to human papillomavirus type 16 L1 protein expressed by recombinant vaccinia virus lacking serine protease inhibitor genes. *J. Gen. Virol.*, **71**:2185-2190.
- . **Zhou J., Sun X.Y., Stenzel D.J., Frazer I.H.** (1991). Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*, **185**:251-7.
- . **Zlotnick A.** (1994). To build a virus capsid. An equilibrium model of the self assembly of polyhedral protein complexes. *J. Mol. Biol.*, **241**:59-67.
- . **Zlotnick A., Johnson J.M., Wingfield P.W., Stahl S.J., Endres D.** (1999). A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly. *Biochemistry*, **38**:14644-52.

. **zur Hausen H.** (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**:690-698.

. **zur Hausen H., de Villiers E.M., Gissmann L.** (1981). Papillomavirus infections and human genital cancer. *Ginecol. Oncol.*, **12**:124-128.

ANEXO 1

ALINEAMIENTOS DE LAS SECUENCIAS DE ADN DE L1 DE VPH18

Se muestran los alineamientos de las secuencias obtenidas para las distintas construcciones, comparadas con el prototipo de número de acceso de GenBank X05015 (Cole & Danos, 1987), corregido por Meissner (Meissner, 1997). Las construcciones presentes en los alineamientos son:

- **18L1Z α** : construcción correspondiente a la región L1 completa en *P. pastoris* para la expresión de la proteína como proteína secretada. Obtenida a partir de la muestra clínica 2V3VPH.
- **18VLPZ**: construcción correspondiente a la región L1 completa en *P. pastoris*, para producción de VLPs. Obtenida a partir de la muestra clínica 2V3VPH.
- **GST- Δ N7118L1**: construcción correspondiente a la región L1 completa delecionada en 71 aminoácidos en el extremo N-terminal, para su expresión en *E. coli*. Obtenida a partir de la muestra clínica 2V3VPH.
- **GST-18L1Ct**: construcción correspondiente a la región C-terminal de la proteína L1 para su expresión en *E. coli*. Obtenida a partir de la muestra clínica 1V3VPH.
- **Δ N6118VLP**: construcción correspondiente a la región L1 completa delecionada en 61 aminoácidos, para la expresión de la proteína en células de insecto. Es la misma secuencia que la correspondiente a la construcción Δ N6118VLPZ, para producción de VLPs en *P. pastoris*. Obtenida a partir del plásmido 45152 (ATCC).

En rojo se muestran los tres triplete ATG situados en el mismo marco de lectura correspondientes al ORF de la proteína L1. En azul las bases que difieren respecto al prototipo. En negrita y subrayado, los codones de parada. En amarillo una deleción generada durante la obtención de la construcción GST-18L1Ct.

	10	20	30	40	50	60
XO5015	ATG	TGCCTGTATACACGGGTCTGATATTACATTACCATCTACTACCTCTGTATGGCCCA				
18L1Z α	CT					
18VLPZ	CT					
	70	80	90	100	110	120
XO5015	TGTGATCACCACGGCCCTGCCTCTACACAGTATATTGGTATAC	ATC	GTACACATTATT			
18L1Z α	A					
18VLPZ	A					
	130	140	150	160	170	180
XO5015	ATTTGTGGCCATTATATTATTTATTCCTAAGAAACGTAAACGTGTTCCCTATTTTTTTTG					
18L1Z α						
18VLPZ						
	190	200	210	220	230	240
XO5015	CAGATG	GCTTTGTGGCGGCTAGTGACAATACCGTATATCTTCCACCTCCTTCTGTGGCA				
GST- Δ N7118L1						
18L1Z α	A					
18VLPZ	A					
Δ N6118VLP						
	250	260	270	280	290	300
XO5015	AGAGTTGTAAATACCGATGATTATGTGACTCGCACAAAGCATATTTTATCATGCTGGCAGC					
GSTN7118L1						
18L1Z α						
18VLPZ						

Anexo 1

ΔN6118VLP
	310 320 330 340 350 360
XO5015
GST-ΔN7118L1	TCTAGATTATTAACTGTTGGTAATCCATATTTAGGGTTCCTGCAGGTGGTGGCAATAAG
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP
	370 380 390 400 410 420
XO5015
GST-ΔN7118L1	CAGGATATTTCCTAAGGTTCTGCATACCAATATAGAGTATTTAGGGTGCAGTTACCTGAC
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP
	430 440 450 460 470 480
XO5015
GST-ΔN7118L1	CCAAATAAATTTGGTTTACCTGATACTAGTATTATATAATCCTGAAACACAACGTTAGTG
18L1ZαA.....
18VLPZA.....
ΔN6118VLPA.....
	490 500 510 520 530 540
XO5015
GST-ΔN7118L1	TGGGCCCTGTGCTGGAGTGGAAATTGGCCGTGGTCAGCCTTTAGGTGTTGGCCTTAGTGGG
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP
	550 560 570 580 590 600
XO5015
GST-ΔN7118L1	CATCCATTTTATAATAAATTAGATGACACTGAAAGTTCCCATGCCGCCACGTCTAATGTT
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP
	610 620 630 640 650 660
XO5015
GST-ΔN7118L1	TCTGAGGACGTTAGGGACAATGTGTCTGTAGATTATAAGCAGACACAGTTATGTATTTTG
18L1Zα
18VLPZ
N6118VLP
	670 680 690 700 710 720
XO5015
GST-ΔN7118L1	GGCTGTGCCCCCTGCTATTGGGGAACACTGGGCTAAAGGCACTGCTTGTAATCGCGTCCT
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP
	730 740 750 760 770 780
XO5015
GST-ΔN7118L1	TTATCACAGGGCGATTGCCCCCTTTAGAACTTAAAAACACAGTTTGGGAAGATGGTGAT
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP
	790 800 810 820 830 840
XO5015
GST-ΔN7118L1	ATGGTAGATACTGGATATGGTGCCATGGACTTTAGTACATTGCAAGATACTAAATGTGAG
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP

	850	860	870	880	890	900
XO5015					
GST-ΔN7118L1	GTACCATG	GATATTTG	TCAGTCTAT	TTGTAAATAT	CCTGATTAT	TTACAAATGTCTGCA
18L1Zα					
18VLPZ					
ΔN6118VLP					
	910	920	930	940	950	960
XO5015					
GST-ΔN7118L1	GATCCTTAT	GCGGATTCC	ATGTTTTT	TGCTTACG	GCGTGAGC	AGCTTTTGCTAGGCAT
18L1Zα					
18VLPZ					
ΔN6118VLP					
	970	980	990	1000	1010	1020
XO5015					
GST-ΔN7118L1	TTTGGGAAT	AGAGCAGT	ACTATGGG	TGACACTGT	GCCTCAATC	CTTATATATAAGGC
18L1Zα					
18VLPZ					
ΔN6118VLP					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
XO5015					
GST-ΔN7118L1	ACAGGTATG	CGTGCTTC	ACCTGGC	AGCTGTGT	GATTCTCC	CTCTCCAAGTGGCTCTATT
18L1Zα					
18VLPZ					
ΔN6118VLP					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
XO5015					
GST-ΔN7118L1	GTTACCTCT	GACTCCC	AGTTGTTT	ATAAAACC	ATATTGGT	TACATAAGGCACAGGGTCAT
GST18L1Ct					
18L1Zα					
18VLPZ					
ΔN6118VLP					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
XO5015					
GST-ΔN7118L1	AACAATGGT	GTTTGCTG	GCATAAT	CAATTATT	TGTACTGT	GGTAGATACCACTCGCAGT
GST18L1Ct					
18L1Zα					
18VLPZ					
ΔN6118VLP					
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
XO5015					
GST-ΔN7118L1	ACCAATTTA	ACAATATG	TGCTTCT	TACACAGT	CTCCTGT	TACCTGGGCAATATGATGCTACC
GST18L1Ct					
18L1Zα					
18VLPZ					
ΔN6118VLP					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
XO5015					
GST-ΔN7118L1	AAATTTAAG	CAGTATAG	CAGACATG	TTGAGGA	ATATGATT	TGCAGTTTATTTTCAGTTG
GST18L1Ct					
18L1Zα					
18VLPZ					
ΔN6118VLP					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
XO5015					
GSTN7118L1	TGTACTATT	ACTTTAA	CTGCAGAT	GTTATGT	CCTATATT	CATAGTATGAATAGCAGTATT
GST18L1Ct					
18L1Zα					
18VLPZ					
ΔN6118VLP					

Anexo 1

	1390	1400	1410	1420	1430	1440
XO5015	TTAGAGGATTGGAAC	TTTGGTGT	TCCCCCCC	GCCAACTACTAGTTTGGTGGATACATAT		
GST-ΔN7118L1
GST18L1Ct
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
XO5015	CGTTTTGTACAATCTGTTGCTATTACCTGTCAAAGGATGCTGCACCGGCTGAAAAATAAG					
GSTN7118L1
GST18L1Ct
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
XO5015	GATCCCTATGATAAGTTAAAGTTTGGATGTGGATTTAAAGGAAAAGTTTCTTTAGAC					
GST-ΔN7118L1
GST18L1Ct	C
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
XO5015	TTAGATCAATATCCCCTTGGACGTAAATTTTGGTTCAGGCTGGATTGCGTCGCAAGCCC					
GST-ΔN7118L1
GST18L1Ct	A	A	C
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
XO5015	ACCATAGGCCCTCGCAAACGTTCTGCTCCATCTGCCACTACGTCTTCTAAACCTGCCAAG					
GST-ΔN7118L1
GST18L1Ct
18L1Zα
18VLPZ
ΔN6118VLP
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
XO5015	CGTGTGCGTGTTACGTGCCAGGAAG	TAA
GST-ΔN7118L1	CTCGAGCGGCCGCATCGTGACT	TGA
GST18L1Ct	AAGGCGCAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCAT
18L1Zα	GCG
18VLPZ	TAG
ΔN6118VLP	TAA
	1750					
GST18L1Ct
	CGTGACTGACT	TGA

ALINEAMIENTOS DE LAS SECUENCIAS DE LA PROTEÍNA L1 DE VPH18

Se muestran las secuencias de aminoácidos deducidas de cada una de las construcciones, con respecto a la secuencia prototipo. Recuadrados en azul se señalan los aminoácidos que difieren respecto a ésta. En rojo se señala la primera metionina considerada en la secuencia prototipo XO5015 (GenBank), en verde la segunda metionina, considerada por algunos autores (Webb *et al.*, 2005), en amarillo la metionina denominada consenso, a partir de la cual se generan VLPs.

	10	20	30	40	50	60
X05015	CLYTRVLILHYHLLPLYGPLYHPRPLPLHSILVY	MVHIIICGHYIILFLRNVNVFPIFL				
18L1Zα	S		Q			
18VLPZ	S		Q			
	70	80	90	100	110	120
X05015	QMALWRPSDNTVYLPSPSVARVNTDDYVTRTSIFYHAGSSRLLTVGNPYFRVPAGGGNK					
GST-N7118L1						
18L1Zα	M					
18VLPZ	M					
ΔN6118VLP						
	130	140	150	160	170	180
X05015	QDIPKVSAYQYRVFRVQLPDPNKFGLPDTSIYNPETQRLVWACAGVEIGRGQPLGVLSG					
GST-ΔN7118L1			N			
18L1Zα			N			
18VLPZ			N			
ΔN6118VLP						
	190	200	210	220	230	240
X05015	HPFYNKLDDESSHAATSNVSEDVRDNVSDYKQTQLCILGCAPAIGEHWAKGTACKSRP					
GST-ΔN7118L1						
18L1Zα						
18VLPZ						
ΔN6118VLP						
	250	260	270	280	290	300
X05015	LSQGDCCPPELKNTVLEDDGMDVTGYGAMDFSTLQDTKCEVPLDICQSICKYPDYLQMSA					
GST-ΔN7118L1						
18L1Zα						
18VLPZ						
ΔN6118VLP						
	310	320	330	340	350	360
X05015	DPYGDSMFFCLRREQLFARHFWRNAGTMGDTVPSLYIKGTGMRASPGSCVSPSPSGSI					
GST-ΔN7118L1						
18L1Zα						
18VLPZ						
ΔN6118VLP						
	370	380	390	400	410	420
X05015	VTSDSQLFNKPYPWLHKAQGHNNNGVCWHNQLFVTVDVDTTRSTNLTICASTQSPVPGQYDAT					
GST-ΔN7118L1						
GST18L1Ct						
18L1Zα						
18VLPZ						
ΔN6118VLP						
	430	440	450	460	470	480
X05015	KFKQYSRHHVEEYDLQFIFQLCTITLTADVMSYIHSMNSSILEDWNFGVPPPTSLVDY					
GST-ΔN7118L1						
GST18L1Ct						
18L1Zα						
18VLPZ						
ΔN6118VLP						
	490	500	510	520	530	540
X05015	RFVQSVAITCQKDAAPAEKNDPYDKLFWNVDLKEKFSLDLDQYPLGRKFLVQAGLRKRP					
GST-ΔN7118L1						
GST18L1Ct						
18L1Zα						
18VLPZ						
ΔN6118VLP						

Anexo 1

	550	560	570	580

X05015	TIGPRKRSAPSATTSSKPAKRVRVRARK*			
GST-ΔN7118L1LERPHRD*			
GST18L1CtVPGRRANSRVDSSGRIVTD*			
18L1Zα*			
18VLPZ*			
ΔN6118VLP*			

ANEXO 2

TABLA DE FRECUENCIA DE UTILIZACIÓN DE CODONES

En la siguiente tabla se muestra la frecuencia de utilización de codones empleados en *P. pastoris* (analizados 81.301 codones, datos de NCB *Taxonomy browser*) y L1 de VPH18 (569 codones), por orden de frecuencia de utilización. Entre paréntesis se muestra la frecuencia relativa en tanto por ciento.

AMINOÁCIDO	ORDEN	<i>P. pastoris</i>	VPH18
Phe (F)	1º	UUU (53,9)	UUU (91,3)
	2º	UUC (46,1)	UUC (8,7)
Leu (L)	1º	UUG (32,7)	UUA(47,1)
	2º	CUU (16,5)	UUG (27,5)
	3º	UUA (16,2)	CUU (9,8)
	4º	CUG (15,5)	CUG (7,8)
	5º	CUA (11,2)	CUA (7,8)
	6º	CUC (7,9)	CUC (0)
Ser (S)	1º	UCU (29,2)	UCG (45,5)
	2º	UCC (19,8)	AGU (25)
	3º	UCA (18,1)	UCC (11,4)
	4º	AGU (15,0)	AGC (11,4)
	5º	AGC (9,1)	UCA (4,5)
	6º	UCG (8,8)	UCU (0,40)
Tyr (Y)	1º	UAC (53,1)	UAU (89,7)
	2º	UAU (46,9)	UAC (10,3)
Cys (C)	1º	UGU (63,7)	UGU (75,0)
	2º	UGC (36,3)	UGC (25,0)
Trp (W)		UGG (100)	UGG (100,0)
Pro (P)	1º	CCA (41,7)	CCU (51)
	2º	CCU (34,7)	CCA (23,4)
	3º	CCC (14,9)	CCC (23,4)
	4º	CCG (8,7)	CCG (2,1)
His (H)	1º	CAU (56,6)	CAU (75,0)
	2º	CAC (43,4)	CAC (25,0)
Gln (Q)	1º	CAA (61,0)	CAG (61,5)
	2º	CAG (39,0)	CAA (38,5)
Arg (R)	1º	AGA (48,0)	CGU (39,3)
	2º	CGU (16,5)	AGA (21,4)
	3º	AGG (16,0)	AGG (17,9)
	4º	CGA (9,9)	CGG (14,3)
	5º	CGC (5,1)	CGC (7,1)
	6º	CGG (4,6)	CGA (0)
Ile (I)	1º	AUU (50,4)	AUU (80,0)
	2º	AUC (31,5)	AUA (20,0)
	3º	AUA (18,1)	AUC (0)
Met (M)		AUG (100)	AUG (100)

AMINOÁCIDO	ORDEN	<i>P. pastoris</i>	VPH18
Thr (T)	1º	ACU (39,5)	ACU (45,9)
	2º	ACC (25,5)	ACA (27,0)
	3º	ACA (24,3)	ACC (21,6)
	4º	ACG (10,7)	ACG (5,4)
Asn (N)	1º	AAC (51,5)	AAU (77,3)
	2º	AAU (48,5)	AAC (22,7)
Lys (K)	1º	AAG (53,0)	AAA (48,1)
	2º	AAA (47,0)	AAG (51,9)
Val (V)	1º	GUU (42,1)	GUU (37,2)
	2º	GUC (23,3)	GUA (30,2)
	3º	GUG (19,2)	GUG (30,2)
	4º	GUA (15,5)	GUC (2,3)
Ala (A)	1º	GCU (44,9)	GCU (48,4)
	2º	GCC (25,7)	GCC (25,8)
	3º	GCA (23,4)	GCA (25,8)
	4º	GCG (6,0)	GCG (0)
Asp (D)	1º	GAU (58,0)	GAU (74,3)
	2º	GAC (42,0)	GAC (25,7)
Glu (E)	1º	GAA (56,3)	GAA (64,3)
	2º	GAG (43,7)	GAG (35,7)
Gly (G)	1º	GGU (43,7)	GGU (40,0)
	2º	GGA (32,6)	GGC (37,1)
	3º	GGC (13,8)	GGA (11,4)
	4º	GGG (9,9)	GGG (11,4)

